

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-121350
(P2003-121350A)

(43) 公開日 平成15年4月23日 (2003.4.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード (参考)
G 0 1 N 21/27		G 0 1 N 21/27	C 2 G 0 4 3
21/05		21/05	2 G 0 4 5
21/64		21/64	G 2 G 0 5 7
30/88		30/88	Z 2 G 0 5 9
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5
審査請求 未請求 請求項の数35 O L (全 31 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-226574(P2002-226574)
(22) 出願日 平成14年8月2日 (2002.8.2)
(31) 優先権主張番号 特願2001-238883(P2001-238883)
(32) 優先日 平成13年8月7日 (2001.8.7)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005968
三菱化学株式会社
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(72) 発明者 高山 英士
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内
(72) 発明者 宗林 孝明
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内
(74) 代理人 100092978
弁理士 真田 有

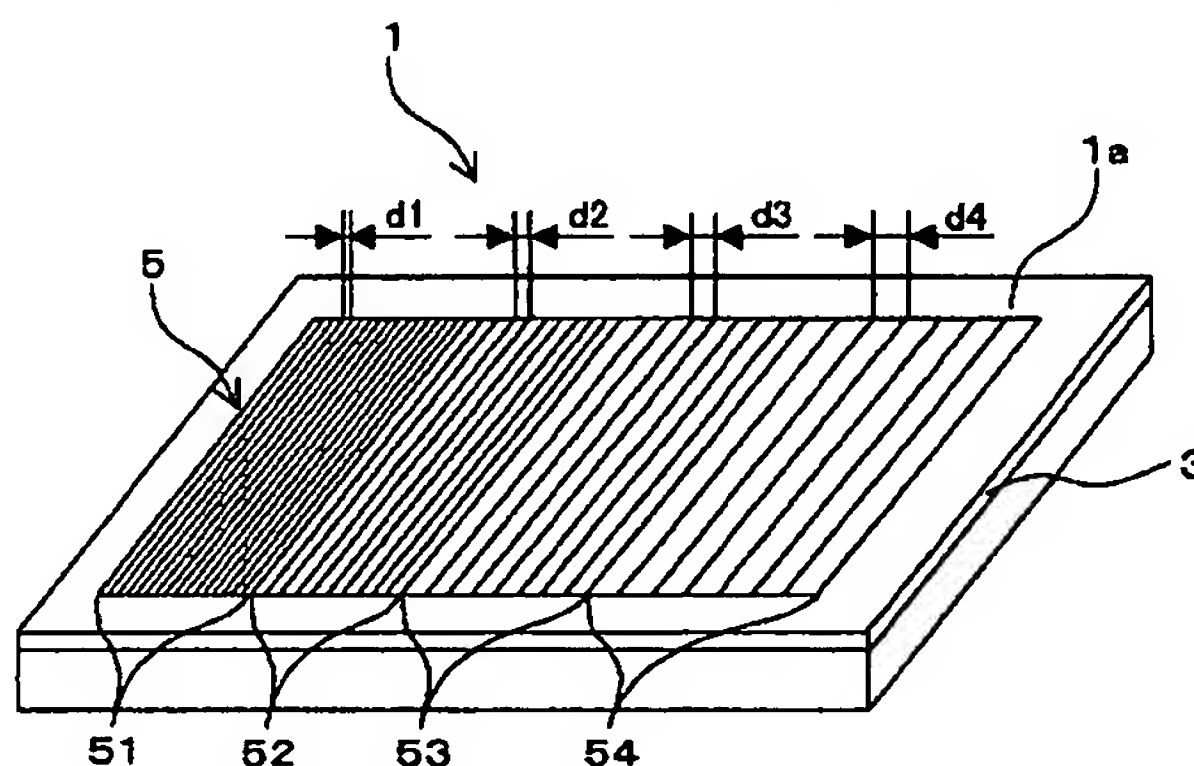
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置

(57) 【要約】

【課題】 回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いた試料の分析において、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、限られた計測レンジにおいて光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行えるようにし、単波長光源を角度変化させることなく、一定角度で試料の分析を行なえるようにする。

【解決手段】 光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起する金属層3と、金属層3の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子5が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された複数の回折格子面51、52、53、54とを備え、各回折格子面は、所定の基準平面1aに平行に設けられ、各回折格子面51、52、53、54には同一の溝方向で且つ互いに異なる溝ピッチで回折格子5が形成されていることを特徴としている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、
上記金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された複数の回折格子面とを備え、
上記各回折格子面は所定の基準平面に平行に設けられ、
上記各回折格子面には同一の溝方向で且つ互いに異なる溝ピッチで回折格子が形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項2】 上記各回折格子面は試料と接するセンサ面に沿って形成され、上記センサ面には試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が上記回折格子面毎に固定化されていることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項3】 上記結合物質が上記回折格子面毎に複数種固定化されていることを特徴とする、請求項2記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項4】 上記センサ面には、回折格子が形成されていない非回折面が上記各回折格子面と同一平面上に設けられていることを特徴とする請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項5】 上記回折格子面毎に、上記結合物質が固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合をおこさない物質が固定化されるか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とが設けられていることを特徴とする請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項6】 上記回折格子面が溝方向に垂直な方向に並んで配置されるとともに、上記センサ面を覆う蓋を備え、上記センサ面と上記蓋との間には、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路が並列して形成されていることを特徴とする請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項7】 上記回折格子面が溝方向に垂直な方向に並んで配置されるとともに、上記センサ面を覆う蓋を備え、上記センサ面と上記蓋との間には、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路が並列して形成されていて、
上記各流路には、上記回折格子面毎に、上記結合物質が固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合をおこさない物質が固定化されるか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とが設けられていることを特徴とする、請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項8】 請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、
上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、
計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定するステップと、
上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項9】 請求項4記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、
上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、
上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、
上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップと、
補正された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定するステップと、
上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項10】 請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、
上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、
上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、
計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定するステップと、
上記特定された反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項11】 請求項6記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、
異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、
上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、
計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記流路毎に特定するステップと、

上記流路毎に特定された溝ピッチに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項12】 請求項7記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定するステップと、

上記流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定された溝ピッチに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項13】 請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項14】 請求項4記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップと、

補正された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及

び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項15】 請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップと、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と上記選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項16】 請求項6記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を上記流路毎に選定し、上記流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項17】 請求項7記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップと、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内

にある回折格子面を上記流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と上記選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項18】 上記表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離ステップを備えたことを特徴とする、請求項8～17の何れかの項に記載の分析方法。

【請求項19】 試料分離ステップでは、液体クロマトグラフィー、HPLC (high performance liquid chromatography)、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャンネルを用いた分離方法のいずれかの手法により試料を分離することを特徴とする、請求項18記載の分析方法。

【請求項20】 上記検出種は発光物質であり、上記センサ面に光を照射するに先立ち、或いは、上記センサ面に光を照射して反射光を受光した後、上記結合物質に結合した上記発光物質の発光光を検出するステップを備え、

上記分析ステップでは、上記発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うことを特徴とする、請求項8～19の何れかの項に記載の分析方法。

【請求項21】 請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、
上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、
上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定し、上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項22】 請求項4記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、
上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一

定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正する補正手段と、

上記補正手段により補正された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定し、上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項23】 請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段で計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定し、上記特定された反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項24】 請求項6記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、

上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記流路毎に特定し、上記流路毎に特定された溝ピッチに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定

性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項25】 請求項7記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、

上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを上記流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定し、上記流路毎に特定された反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項26】 請求項2又は3記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、

上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項27】 請求項4記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正する補正手段と、

上記補正手段により補正された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、

上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項28】 請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に上記試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定する測定手段と、

測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と上記選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項29】 請求項6記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、

上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光

を照射する光照射手段と、
 上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、
 上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、
 上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、
 上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を上記流路毎に選定し、上記流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項30】 請求項7記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、
 上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、
 上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、
 上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、
 上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、
 上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、
 上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定する測定手段と、
 上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を上記流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記流路毎に選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項31】 上記表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離手段を備えたことを特徴とする、請求項21～30の何れかの項に記載の分析装置。

【請求項32】 上記試料分離手段は、液体クロマトグラフィー、HPLC (high performance liquid chromatography)、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャネ

ルを用いた分離方法のいずれかの手法により試料を分離することを特徴とする、請求項31記載の分析装置。

【請求項33】 上記検出種は発光物質であり、上記受光手段は上記結合物質に結合した上記発光物質の発光光も検出可能に構成され、

上記分析手段は、上記受光手段による上記発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うように構成されていることを特徴とする、請求項21～32の何れかの項に記載の分析装置。

【請求項34】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成された表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、
 上記共鳴領域は上記センサ面に離散的に形成された複数の連続領域からなり、上記複数の連続領域のうち少なくとも一つの連続領域は他の連続領域とは上記回折格子の溝ピッチ及び溝方向のうち少なくとも一つの要素が相違していることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項35】 試料と接するセンサ面の近傍に金属層と回折格子とが設けられて、光の照射により上記金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と上記回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面に形成された表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記共鳴領域は上記センサ面に連続的に形成され、上記回折格子の溝方向は一定で溝ピッチに連続的或いは不連続的な分布を有していることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した試料分析のための回折格子型のセンサチップ (表面プラズモン共鳴センサチップ) の構造と、それを用いて行う試料の分析方法及び分析装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生化学や医療検査等の分野における固相表面における被分析物の分析方法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴は、金属層に光が入射した場合に金属表面に誘起される表面プラズモン波が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象である。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度に依存しており、表面プラズモン共鳴が励起されたときには、特定の入射角又は特定の波長を有する光成分の光エネルギーが表面プラズモン波と共鳴し結合 (Coupling) することにより、対応する入射角又は波長を有する反

射光が大きく減少するという特徴がある。

【0003】表面プラズモン共鳴を起こすためには、特定の表面プラズモン波を有する金属と、表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波を誘起する光学構造とが必要となる。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。なお、上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ（以下、単にセンサチップという）と呼ばれている。

【0004】通常、センサチップは基体に金属層を積層した構造を有し、金属層上には、特定の検出種（被分析物）と相互作用して特異的に結合する結合物質が塗布されて固定化される。この結合物質が固定化された金属層の表面に試料を接触させることにより、結合物質に試料中の検出種が捕捉される。表面プラズモン共鳴は金属層の表面における媒質の屈折率にも依存しており、媒質の屈折率が変化すれば波長一定の場合には共鳴角が変化し、また、入射角度一定の場合には共鳴波長が変化する。したがって、反射光の強度に基づき共鳴角或いは共鳴波長を調べることで金属層の表面における媒質の屈折率を分析することができる。この場合、金属層の表面の媒質の屈折率の変化は、結合物質に捕捉される検出種の物質質量、すなわち試料中の検出種の濃度の変化に対応していることから、表面プラズモン共鳴が起きる共鳴角或いは共鳴波長を調べることで、試料中の検出種の濃度を分析することができる。

【0005】このようなセンサチップのうち、プリズム型のセンサチップは、プリズム内を伝播する光を全反射させ、生起されたエバネッセント波と表面プラズモン波とを結合させるようにしたものである。一方、回折格子型のセンサチップは、通常、金属が堆積された結果が回折格子になるように基板面に平行な一定ピッチの凹凸形状（グレーティング）を形成し、それに金属を堆積することで金属の回折格子を形成している。そして、高次の回折光を利用して導体表面にエバネッセント波を生起させ、その表面進行波と金属表面の表面プラズモン波の波数及び角振動数が一致した時の共鳴による反射率の低下によって、金属表面又は金属表面に接する物質の性質が検出されるようになっている（特許1903135号、特許2502222号等参照）。

【0006】ここで図25は回折格子型のセンサチップにおける表面プラズモン波、エバネッセント波及び照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示す分散関係図である。図中、曲線A1、A2は表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示しており、曲線A1は曲線A2よりも媒質の屈折率が大きい場合を示している。一方、直線B0は照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示し、直線B1はこの照射光に対応する特定次数のエバ

ネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。図25中、曲線A1或いはA2と直線B1との交点P11、P12が表面プラズモン共鳴が起きる共鳴ポイントを示し、その共鳴ポイントに対応する波長及び入射角が共鳴波長及び共鳴角度となる。この共鳴ポイントでは反射光の強度は極小値を示す。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】回折格子型のセンサチップを用いて行う分析方法には、入射角度一定で波長を変化させる（或いは多成分の光を照射する）波長変化型と、波長一定で入射角度を変化させる角度変化型の2つの方法がある。このうち、波長変化型では、通常、白色光（多成分の光）を入射角度一定で照射し、各波長の反射光の反射率を計測することによって表面プラズモン共鳴による吸収ピークを計測する。反射率の計測は、通常、計測レンジの制約から図25中に示すように特定領域（角振動数 $\omega_1 \sim \omega_2$ ）の反射光について行われる。

【0008】ところが、表面プラズモン波は、金属層と試料（誘電体）のそれぞれの誘電率（すなわち屈折率）によって波数と振動数との関係が決まるため、試料の屈折率によっては、図25中に示す共鳴ポイントP12のように、共鳴ポイントが計測レンジから逸脱してしまう虞がある。特に、複数のスポットに異なる結合物質を固定化して幅広い誘電率（屈折率）の分布を持つ試料を検出する場合や、分析時に段階的に生成される新たな物質（例えば、酵素反応により生じる沈着色素など）により各スポットにおける誘電率（屈折率）が変化する場合には、これらのスポットを同時に計測を行うときには、共鳴現象が検出できるスポットと検出できないスポットが混在する虞がある。この場合は、全てのスポットについて共鳴現象を計測するために、入射角度を変更する等の光学系の再調整が必要になってしまう。なお、全ての共鳴ポイントが計測レンジに入るように、計測レンジを広げて波長帯を広く取るという考えもあるが、波長帯を広く取りすぎると、広範囲の波長が検出できるものの分解能が下がってしまうという新たな課題が生じてしまう。

【0009】一方、角度変化型には2つの形態が知られている。その第1の形態では、通常、単一波長の光を照射角度を変えながら照射し、各照射角度における反射光を計測することによって、表面プラズモン共鳴による吸収ピークを検出する。しかしながら、この方法においても、光の照射角度に制限があるため、波長変化型と同様に計測レンジに制約が生じてしまう。

【0010】角度変化型の第2の形態は、図26(a)に示すように、光源102から単波長の光を所定の広がり角を持って照射し、これをセンサチップ101の金属層の表面に垂直でない所定の角度で入射させ、その反射光を反射鏡103を介して光検出器（フォトダイオードアレイ）104で検出するようにしたものである。この

場合は、図26(b)に示すようにセンサチップ101での入射位置に応じて照射光の入射角度が変わるので、結果的に角度 θ_a から角度 θ_b まで入射角度を連続的に変えながら単波長の光を照射したことになる。

【0011】しかしながら、この方法によっても、上述の波長変化型や角度変化型の第1の形態と同様に計測レンジに関する問題は依然としてあり、また、光学系が複雑で装置自体が大型化してしまうという課題もある。更に、反射鏡103が僅かに変形しただけで光路にずれが生じ、測定精度に影響を与えてしまうという課題もある。

【0012】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、その第1の目的は、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、限られた計測レンジにおいて光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行えるようにした、表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0013】また、その第2の目的は、角度変化が必要でなく、それ故、分析時間が短く、簡単な光学系により短波長の光による試料の分析を可能にした、表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、その回折格子を従来のように一定の均一な溝ピッチで形成するのではなく、光の入射方向から見た実質的な溝ピッチに分布が生じるように形成することで、上記の第1の目的及び第2の目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

【0015】まず、本発明の第1の表面プラズモン共鳴センサチップ(第1のセンサチップ)は、光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、上記金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された複数の回折格子面とを備え、上記各回折格子面は、所定の基準平面に平行に設けられ、上記各回折格子面には同一の溝方向で且つ互いに異なる溝ピッチで回折格子が形成されていることを特徴としている。

【0016】このような構成により、一定の方向から光(平行光)を照射したときには、各回折格子面の溝ピッチに応じた波数と各振動数との関係を有するエバネッセント波が生じる。これにより、一つの表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じることになる。したがって、各回折格子面から得られる反射光の強度と各回折格子面の溝ピッチとに基づき、複数の共鳴ポイントをリアルタイムで算出することが可能になる。つまり、上記のような構成のセンサチップを用いることにより、簡単な光学系によっ

て複数の共鳴ポイントを検出することができる。

【0017】上記の第1のセンサチップにおいて、各回折格子面は試料と接するセンサ面に沿って設けられている。そして、第1のセンサチップを試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、センサ面に試料中の検出種(化学種、生化学種又は生物種等)と特異的に結合する結合物質(抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質)を固定化したものを用いる(請求項2)。特に、多点同時測定用のセンサチップの場合には、各領域に対応して結合物質を複数種固定化したものを用いることによって、同時に複数種の検出種について分析が可能になる(請求項3)。

【0018】また、上記センサ面に、回折格子が形成されていない非回折面を上記各回折格子面と同一平面上に設けてもよい(請求項4)。また、上記回折格子面毎に、上記結合物質が固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合を起こさない物質とを固定化するか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とを設けても良い(請求項5)。また、上記回折格子面を溝方向に垂直な方向に並んで配置するとともに、上記センサ面を覆う蓋を設け、上記センサ面と上記蓋との間に、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路を並べて形成しても良い(請求項6)。

【0019】また、上記回折格子面を溝方向に垂直な方向に並んで配置するとともに、上記センサ面を覆う蓋を設け、上記センサ面と上記蓋との間に、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路を並べて形成し、さらに、上記各流路の回折格子面毎に、上記結合物質が固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合を起こさない物質とを固定化するか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とを設けても良い(請求項7)。

【0020】第1のセンサチップを用いて行う試料の分析方法には、次の10個の方法がある。第1の分析方法は共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定するステップ、上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する(請求項8)。

【0021】この場合、瞬時に複数の共鳴ポイントを算出することができるので、リアルタイム測定が可能になるとともに、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行うこ

とができる。したがって、回折格子面が集約配置された領域が複数設けられた多点同時測定用のセンサチップを用いた場合には、多点同時測定をリアルタイムに行うこともできる。また、光源の光軸は一定でよく且つ平行光でよいので光学系も簡単にすることができる。なお、これらの各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の検出種が結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0022】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、分析手段を備えている。分析手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定し、上記特定された溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項21）。

【0023】第2の分析方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップ、補正された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定するステップ、上記特定された溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項9）。

【0024】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、非回折面からの反射光の強度を考慮して各回折格子面からの反射光の強度を補正するため、各回折格子面の表面特性の差による反射光の強度の誤差を補正することができる。

【0025】なお、表面特性とは、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象以外のセンサチップ表面にかかる要素のうち、センサチップからの反射光強度を弱めるものをいう。例えば、入射光を散乱させる試料溶液の濁りや、資料用液中に含まれる入射光の吸収物質などの、センサチップからの反射光を弱める要素や、ゆがみ、たわみ、膨潤、収縮など微量な理想平面からの変位

のことをいう。また他にも、試料中の成分がセンサチップ表面に非特異的に吸着する場合には、この非特異的に吸着した物質によって入射光は散乱されたり吸収されたりして、センサチップからの反射光の強度は減少する。

【0026】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、補正手段と分析手段とを備えている。補正手段は、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正する手段であり、分析手段は、補正手段により補正された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを特定し、上記特定された溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項22）。

【0027】第3の分析方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、センサ面に試料を接触させて、一定の入射角度で光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定するステップ、特定された反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項10）。

【0028】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づいて分析を行うため、反応によって生じる検出種の変化をより正確に分析することができる。

【0029】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、分析手段を備えている。

分析手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを反応領域及び非反応領域それぞれについて特定し、上記特定された反応領域及び非反応領域それぞれの溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項23）。

【0030】第4の方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを、各流路を流れる試料毎に特定するステップ、流路毎に特定された溝ピッチに基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項11）。

【0031】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、複数の検出種を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することができる。

【0032】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、分析手段を備えている。分析手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを各流路毎について特定し、上記流路毎に特定された溝ピッチに基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項24）。

【0033】第5の分析方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強

度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを、各流路を流れる試料毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定するステップ、流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定された溝ピッチに基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項12）。

【0034】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、複数の検出種を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することができる。また、反応によって生じる検出種の変化を各流路においてより正確に分析することができる。

【0035】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、分析手段を備えている。分析手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度に基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている溝ピッチを各流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて特定し、上記流路毎に特定された反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項25）。

【0036】第6の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、測定した変化量が所定の測定許容範囲（測定レンジ）内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項13）。

【0037】これにより、試料の濃度域が広い場合でも測定値が測定レンジ内に入るように光学系を再調整する

必要がなく、実質的に測定レンジを拡大することが可能になる。なお、この場合も各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0038】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項26）。

【0039】第7の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された上記各非回折格子面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップ、補正された各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、測定した変化量が所定の測定許容範囲（測定レンジ）内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項14）。

【0040】この場合、第6の分析方法と同様の利点の他、非回折面からの反射光の強度を考慮して各回折格子面からの反射光の強度を補正するため、各回折格子面の表面特性の差による反射光の強度の誤差を補正することができる。

【0041】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計

測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、補正手段と測定手段と分析手段とを備えている。補正手段は、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正する手段であり、測定手段は、補正手段により補正された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項27）。

【0042】第8の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップ、測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項15）。

【0043】この場合、第6の分析方法と同様の利点の他、反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づいて分析を行うため、反応によって生じる検出種の変化をより正確に分析することができる。

【0044】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量と選定された非

反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項28）。

【0045】第9の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度の、各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に選定し、流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項16）。

【0046】この場合、第6の分析方法と同様の利点の他、複数の検出種を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することができる。

【0047】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に選定し、選定した回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項29）。

【0048】第10の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各

回折格子面からの反射光の強度の、各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップ、測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に反応領域と非反応領域のそれぞれについて選定し、流路毎に選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項17）。

【0049】この場合、第6の分析方法と同様の利点の他、複数の検出種を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することができる。また、反応領域及び非反応領域のそれぞれの溝ピッチに基づいて分析を行うため、反応によって生じる検出種の変化を各流路においてより正確に分析することができる。

【0050】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記流路毎に選定した反応領域からの反射光の強度の変化量と選定した非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項30）。

【0051】さらに、上述の各分析方法において、表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離ステップを行ってもよい（請求項18）。

【0052】これにより、試料中に検出種以外の不純物が混入していたとしても、分析前に適正に除去することができ、純粋な検出種のみを分析することができる。したがって、正確な分析を行うことが可能となる。

【0053】また、これらの分析手段で通常用いられている検出方法（吸光度検出、蛍光検出、化学発光検出、示差屈折計検出、電気化学検出など）と組み合わせることにより、各種の存在物質の存在量と、その中での検出対象種の特異的反応計測による測定とを同時に行うことができる。

【0054】この分析方法は、上述の分析装置の構成に加え、表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離手段を有するように構成した分析装置を用いることで実施できる（請求項31）。

【0055】試料分離手段としては、液体クロマトグラフィー、HPLC、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、マイクロチャンネル或いはフローインジェクションの何れかの手法により試料を分離することが望ましい（請求項19、請求項32）。

【0056】また、上述の各分析方法において、検出種が発光物質である場合に、センサ面に光を照射するに先立ち、或いは、センサ面に光を照射して反射光を受光した後、結合物質に結合した発光物質の発光光を検出するステップを備え、分析ステップでは、発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うようにしてもよい（請求項20）。

【0057】これにより、表面プラズモン共鳴のみでなく、発光現象を利用した分析を行えるようになる。蛍光や燐光等の発光現象は非常に高感度であるため、より微小な反応も検出することが可能となる。

【0058】この分析手段は、上述の分析装置の構成に加えて、検出種が発光物質である場合に、受光手段が結合物質に結合した発光物質の発光光も検出可能に構成され、分析手段が、受光手段による発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うように構成した分析装置を用いることで実施できる（請求項33）。

【0059】次に、本発明の第2の表面プラズモン共鳴センサチップは、光の照射により金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じる共鳴領域をセンサ面に離散的に形成された複数の連続領域として構成し、これら複数の連続領域のうち少なくとも一つの連続領域を他の連続領域とは回折格子の溝ピッチ及び溝方向のうち少なくとも一つの要素が相違したものにしている（請求項34）。なお、ここでいう連続領域とは、共鳴現象の有無の観点において平面的に連続しているセンサ面上の一連の領域を意味している。

【0060】このような構成により、特定の方向から見たときの回折格子の実質的な溝ピッチに分布が生じ、各連続領域では実質的な溝ピッチに応じた波数と角振動数との関係を有するエバネッセント波が得られる。これにより、一つの表面プラズモン波に対して角振動数の異なる

複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じることになる。

【0061】また、本発明の第3の表面プラズモン共鳴センサチップは、光の照射により金属層の表面に誘起される表面プラズモン波と回折格子の作用により生じるエバネッセント波との共鳴現象が生じる共鳴領域をセンサ面に連続的に形成され、この回折格子の溝方向は一定で溝ピッチには連続的或いは不連続的な分布を持たせている（請求項35）。なお、ここでいう溝ピッチの連続的な分布とは、全ての隣接する溝間において溝ピッチが滑らかに変化していることを意味し、溝ピッチの不連続的な分布とは、少なくとも一つの隣接する溝間において溝ピッチがステップ状に変化していることを意味している。

【0062】このような構成により、連続領域上の各位置では溝ピッチに応じた波数と角振動数との関係を有するエバネッセント波が得られる。これにより、一の表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じることになる。上記の第2、第3の表面プラズモン共鳴センサチップを試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、共鳴領域の表面に試料中の検出種（化学種、生化学種又は生物種等）と特異的に結合する結合物質（抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質）を固定化したものを用いる。そして、以下の光照射ステップ、検出ステップ及び分析ステップからなる分析方法を用いて分析を行う。

【0063】光照射ステップは、センサ面に試料を接触させて、所定の方向から光を照射するステップである。また、検出ステップは、共鳴領域からの反射光を受光し、受光した共鳴領域からの反射光の強度に基づき、共鳴領域での共鳴現象を検出するステップである。そして、分析ステップは、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップである。なお、これらの各ステップは、記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の被分析物が上記結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0064】上記の分析方法は、以下の構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。この分析装置は、上記の表面プラズモン共鳴センサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態の表面プラズモン共鳴センサチップの共鳴領域に向けて所定の方向から光照射手段により光を照射し、共鳴領域からの反射光を受光手段により受光するような装置構成を有している。

【0065】そして、この分析装置は、さらに受光手段

により受光した反射光から試料を分析するための手段として、検出手段と分析手段とを備えている。検出手段は、共鳴領域からの反射光の強度に基づき共鳴領域での共鳴現象を検出する手段であり、分析手段は、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である。

【0066】なお、上記の分析方法における分析ステップでは、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行ってもよい。この場合、分析装置では、共鳴現象が検出された位置における光の入射方向から見た回折格子の実質的な溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うように分析手段を構成すればよい。

【0067】また、上記の分析方法における光照射ステップでは、単一波長の光を一定の入射角度で照射してもよい。この場合、分析装置では、単一波長の光を一定の入射角度で照射するように光照射手段を構成すればよい。上記の表面プラズモン共鳴センサチップを用いれば、このような簡単な光学系によっても共鳴現象が生じる共鳴ポイントを検出することができる。なお、この場合は、連続的な溝ピッチの分布を有している表面プラズモン共鳴センサチップを用いるのが特に好ましい。

【0068】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

(A) 第1実施形態

まず、図1を用いて本発明の第1実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）1の構成について説明する。図1に示すように本実施形態にかかるセンサチップ1は、その表面（センサ面）1aを金属層3により被覆され、金属層3上には回折格子5が形成されている。本実施形態では、回折格子5は均一な溝ピッチではなく、不連続な溝ピッチの分布を持って形成されている。具体的には、回折格子5は溝に垂直な方向に連続する4つの領域51、52、53、54毎に溝ピッチが異なり、領域51から領域54にかけて順に溝ピッチを大きく形成されている（すなわち、 $d_1 < d_2 < d_3 < d_4$ ）。なお、これら各領域51、52、53、54は、それぞれ本発明にかかる回折格子面に相当する。

【0069】この構造によれば、照射光がセンサチップ1のセンサ面1aに照射されると、照射光はセンサ面1a上の回折格子5において回折し、この回折現象によりエバネッセント波が生じる。また、照射光が金属層3に作用することにより金属層3の表面に表面プラズモン波が発生する。そして、特定の波長及び入射角の光が照射

されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴（SPR）が起きる。すなわち、このセンサチップ1では、金属層3上の回折格子5が形成されている領域（連続領域）が共鳴領域となっている。

【0070】センサチップ1の使用時（試料の分析に用いる際）には、図2に示すように回折格子5が形成された共鳴領域上に結合物質6、7が固定化されて、試料中の検出種（化学種、生化学種又は生物種等）と反応する反応領域となる。結合物質6、7は、抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって特定の物質と特異的に結合しうる性質を備えた物質であり、検出すべき検出種に応じた結合物質6、7が選択される。ここでは、異なる検出種に対応する結合物質6、7をそれぞれ各領域51～54に固定化している。

【0071】また、センサチップ上に形成される回折格子の溝ピッチの範囲は200nm～2000nm、好ましくは500nmから900nmである。また、溝深さは10nm～100nmが好ましい。さらに、1つのセンサチップ上には1～200種類、好ましくは2～20種類の溝ピッチを形成する。

【0072】ところで、光の照射により金属層3に誘起される表面プラズモン波は、その波数を k_{sp} [$k_{sp} = 2\pi/\lambda_{sp}$ (波長)] とすると、次の式（数1）で表される。

【0073】

【数1】

$$k_{sp}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega)n_1(\omega)^2}{\epsilon_m(\omega) + n_1(\omega)^2}}$$

【0074】また、回折格子5の作用により生じるエバネッセント波は、その波数を k_{ev} [$k_{ev} = 2\pi/\lambda_{ev}$ (波長)] とすると、次の式（数2）で表される。

【0075】

【数2】

$$k_{ev}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sin \theta + mk_g$$

【0076】なお、数1或いは数2において、 ω は照射光の角振動数、 θ は照射光の入射角、 k_g は回折格子5の格子定数、 m は回折格子5による回折光の回折次数、 $\epsilon_m(\omega)$ は金属層3の誘電率、 $n_1(\omega)$ は金属層3の表面に接する媒質の屈折率、 c は光速を示している。上記の数1、数2の関係を同一のグラフ上に表したものが図3に示す分散関係図である。図3中、曲線A1、A2は表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。数1から明らかなように表面プラズモン波は

金属層 3 の表面の媒質の屈折率に依存していることから、媒質の屈折率が大きくなると表面プラズモン波の角振動数 ω と波数 k との関係を示す曲線も変化する。具体的には、図 2 に示すように金属層 3 の表面に結合物質 6、7 がスポット状に固定化され、これら結合物質 6、7 にそれぞれ対応する検出種が結合したときには、各スポットにおける屈折率は結合した検出種の屈折率や結合量に応じて変化する。ここでは、結合物質 6 が固定化されたスポットの屈折率のほうが結合物質 7 が固定化されたスポットの屈折率よりも大きく、曲線 A 1 は結合物質 6 が固定化されたスポットに対応し、曲線 A 2 は結合物質 7 が固定化されたスポットに対応している。

【0077】一方、図 3 中、直線 B 0 は照射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示し、直線 B 1 ～ B 4 はエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示している。数 2 から明らかなようにエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係は格子定数 k_g により変化するが、この格子定数 k_g は光の入射方向から見たときの回折格子 5 の実質的な溝ピッチにより決まり、この実質的な溝ピッチが狭いほど格子定数 k_g は大きくなる。ここでは直線 B 1 は溝ピッチが最も狭い領域 5 1 で得られるエバネッセント波に対応し、以下、直線 B 2 は領域 5 2 に、直線 B 3 は領域 5 3 に、直線 B 4 は領域 5 4 に対応している。上記の曲線 A 1、A 2 とこれら直線 B 1 ～ B 4 との各交点 P 1 1、P 1 2、P 2 1、P 2 2、P 3 1、P 3 2、P 4 1、P 4 2 が表面プラズモン共鳴が起きる共鳴ポイントを示している。

【0078】試料中の検出種の濃度は、対応する結合物質 6、7 が固定化されたスポットにおける共鳴現象を検出することによって分析することができる。ところが、計測器の計測レンジ（計測波長領域）に制約がある場合には共鳴現象の全てを検出できるわけではない。例えば、計測レンジが ω_1 から ω_2 までの角振動数の範囲に制約されている場合、回折格子 5 の溝ピッチが狭い領域 5 1 ～ 5 3 では、共鳴ポイント P 1 2、P 2 2、P 3 2 が計測レンジ外になるため、結合物質 7 が固定化されたスポットにおける共鳴現象は検出できない。しかしながら、より広い溝ピッチ d_4 を有する領域 5 4 では、共鳴ポイント P 4 2 が計測レンジ内に入るため、結合物質 7 が固定化されたスポットにおける共鳴現象を検出することができる。同様に、結合物質 6 が固定化されたスポットにおける共鳴現象については、領域 5 3、5 4 ではその共鳴ポイント P 3 1、P 4 1 が計測レンジ外になるために検出できないものの、領域 5 1、5 2 では共鳴ポイント P 1 1、P 2 1 が計測レンジ内に入るために計測可能である。

【0079】このように上記のセンサチップ 1 によれば、回折格子 5 の溝ピッチが領域 5 1 ～ 5 4 毎に異なることによって、各領域 5 1 ～ 5 4 において共鳴現象が生じる共鳴ポイントが表面プラズモン波の分散曲線に沿っ

て分布するので、計測レンジに制約がある場合でも高い確率で何れかの領域 5 1 ～ 5 4 において共鳴現象を検出することができる。そして、上述のように複数種の結合物質 6、7 を固定化して屈折率が異なる複数の検出種の分析を行う場合にも、限られた計測レンジの中で光学系の再調整を行うことなく一度に分析を行うことができる。すなわち、広範囲の屈折率分布を有する試料の分析にも対応可能である。

【0080】なお、上記のセンサチップ 1 は、以下のような方法により製造することができる。まず、図 4 (a) に示す基体 2 の表面に、図 4 (b) に示すようにレーザ加工等により凹凸形状（グレーティング）4 を形成する。次いで、図 4 (c) に示すように基体 2 の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層 3 を積層する。凹凸形状 4 上に金属層 3 が積層されることで金属層 3 の表面にも凹凸形状が現れ、この金属層 3 の表面の凹凸形状が回折格子 5 として機能する。

【0081】基体 2 の材質は、表面に凹凸形状 4 を形成することができ、金属層 3 を保持できる機械的強度が十分であるならばその材質に限定はない。例えば無機材料としてガラス、石英、シリコン等が挙げられ、有機材料としてはポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリオレフィン等の樹脂が挙げられる。基体 2 に形成する凹凸形状 4 は、金属層 3 を積層したときにその表面に所望の回折格子 5 が得られるように金属層 3 の厚み等を考慮して形成する。形成方法としては、上述のレーザ加工の他、射出成型、圧縮成型、エッチング等によって形成してもよい。凹凸形状 4 としては、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯状形状等があり得るが、回折格子 5 において回折現象が起き、エバネッセント波を生じせしめることのできる形状であれば形状に限定はない。ただし、凹凸形状 4 の溝ピッチは、連続する 4 つの領域 4 1、4 2、4 3、4 4 毎に異なるようにし、領域 4 1 では溝ピッチを d_1 とし、領域 4 2 では溝ピッチ d_2 、領域 4 3 では溝ピッチ d_3 、領域 4 4 では溝ピッチ d_4 とする。なお、凹凸形状 4 の深さ（回折格子 5 の深さ）は反射光の強度ピークのシャープネスに関係して分解能に影響する。

【0082】金属層 3 は、表面プラズモン波を誘起しうるものであればその材質に限定はない。例えば、金、銀、アルミニウム等を用いることができる。感度や安価な点では銀が好ましいが、安定性の面では金が好ましい。なお、金属層 3 の厚みが小さい場合には、照射光が金属層 3 を透過して基体 2 の表面に達し、照射光が基体 2 表面の凹凸形状 4 により回折する場合もある。この場合は凹凸形状 4 が回折格子として機能することになる。

【0083】基板 2 への金属層 3 の塗布方法は、基板 2 と金属層 3 が十分に強く結合できる方法ならばその方法に限定はない。代表的には蒸着、スパッタリング、めっき等が挙げられる。また、基板 2 と金属層 3 との間に何

らかの別の物質を例えば接着性を挙げるために使用しても構わない。さらに、金属層3の表面に保護膜や活性化膜等をコーティングして、金属層3の表面に何らかの機能を保有させるようにしてもよい。

【0084】なお、上記のセンサチップ1は、図5に示すセンサチップ1'のように変形して実施することも可能である。すなわち、回折格子5の溝ピッチが異なる各領域51～54を連続して並べるのではなく、溝方向を同一にして金属層3上に離散的に配置するのである。このような構造によっても、上記のセンサチップ1と同様の作用効果を得ることができる。

【0085】次に、本実施形態にかかるセンサチップ1の使用方法について説明する。センサチップ1を試料の分析に用いる際には、図2に示すようにセンサ面1aに結合物質6, 7を固定化したものを用いる。そして、このように結合物質6, 7が固定化されたセンサチップ1を図6に示す構成の分析装置10にセットして分析を行う。この分析装置10はセンサチップ1を固定するためのホルダ(保持手段)11、光源(光照射手段)12、光検出器(受光手段)13及び分析部14から主に構成されている。

【0086】ホルダ11には検出種を含む試料流体が通過する流路11aが形成されている。センサチップ1はそのセンサ面1aが流路11aを流れる試料に接するように配置されて固定される。光源12はセンサチップ1のセンサ面1aに向けて光を照射するようにセンサチップ1に対して流路11aを挟んで配置される。光源12は単色光でもよく、多成分の光(例えば白色光)でもよい。また、コヒーレントな光であるか否かも問わない。単色光の光源としては、レーザ光源、特に価格、大きさの点で半導体レーザが好ましい。また、ハロゲン・タングステンランプなどの白色光を干渉フィルターや分光器等で分光して得た単色光を光源として用いることも可能である。一方、白色光の光源としては、ハロゲン・タングステンランプ、キセノンランプ等が好ましい。

【0087】光検出器13はセンサチップ1からの反射光を検出する検出器である。光検出器13としては、例えばCCD素子を集積したものやシリコンフォトダイオードアレイ等が好ましい。なお、図中では省略しているが、P偏光のみが表面プラズモン波を共鳴させることができるため、光源12とセンサチップ1との間、またはセンサチップ1と光検出器13との間には、光源12からの照射光、或いはセンサチップ1からの反射光を偏光するための偏光子が設置されている。

【0088】分析部14は光検出器13からの検出情報に基づき分析処理を行う装置である。分析部14は、本発明にかかる検出手段及び分析手段として機能する。以下、分析部14の各機能とあわせて、本実施形態にかかるセンサチップ1を用いた試料の分析手順について具体的に説明する。まず、センサチップ1をホルダ11にセ

ットしてセンサチップ1のセンサ面1aを試料に接触させる(ステップA1)。これによりセンサ面1aに固定された結合物質6, 7に試料流体中の検出種が特異的に結合する。そして結合した検出種の物質質量に応じて結合物質6, 7が固定化された各スポットの金属層3表面近傍の媒質の屈折率が変化し、各スポットにおける表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0089】次に、光源12からセンサ面1aに向けて照射角度一定で単色光を照射する(ステップA2)。ここでは、結合物質6, 7が固定化された全スポットを照らすように照射光の太さを調整する。これにより、全てのスポットを同時に測定することができる。センサ面1aに照射された照射光は表面に形成された回折格子5において回折光を生じさせる。このうち0次の回折光(反射光)を光検出器13によって検出する(ステップA3)。

【0090】光検出器13により検出された反射光の情報は分析部14に送られる。分析部14は、光検出器13からの反射光の情報から結合物質6, 7が固定された各スポットからの反射光の情報を抽出して、スポット毎に反射光の強度を調べる。そして、各スポットからの反射光の強度に基づき、検出種毎(結合物質6, 7毎)に共鳴現象が生じる回折格子5の溝ピッチを検出する。具体的には、検出種毎に反射光の強度が最小となるスポットを検出し、そのスポットにおいて共鳴現象が生じているものと見なすか、或いは、ソフトウェアを用いて各スポットの反射光の強度に基づき共鳴現象が生じる溝ピッチを補間計算する。(ステップA4-1)。

【0091】そして、分析部14は、共鳴現象が生じる溝ピッチを別途測定して得られた検量線(或いは理論的な濃度換算式)に対応させて、試料中の各検出種の濃度を分析する。ここでは分析部14は本発明にかかる分析手段として機能する(ステップA5-1)。

【0092】一方、反射光強度の変化量に基づき試料の分析を行うこともできる。この方法は、入射角度或いは入射波長に対する反射光の強度分布は、結合物質に捕捉された検出種の量、すなわち試料中の検出種の濃度に応じて変化することから、入射角度、入射波長一定の条件で反射光の強度を計測し、その条件における強度の変化量(試料に接していない状態からの変化量)に基づき濃度等を分析するようにしたものである。この場合は、上述のステップA1からステップA3までの処理によりセンサ面1aからの反射光を検出すると、分析部14は、得られた反射光の情報から、結合物質6, 7が固定された各スポットからの反射光の情報を抽出して、領域51～54毎に反射光の強度を検出する。そして、センサ面1aに試料が接触していない状態に対する反射光強度の変化量を領域51～54毎に測定する(ステップA4-2)。

【0093】次に、分析部14は、反射光強度の変化量

が所定の測定レンジ（測定許容範囲）内にある、すなわちレンジオーバーしていない領域（回折格子）を選定する。そして、選定したレンジオーバーしていない領域からの反射光強度の変化量とその領域の溝ピッチとを検量線（濃度既知の試料を用いた試験により溝ピッチと反射光強度の変化量との関係を予め求めたもの）に照合して、資料中の検出種の濃度を分析する（ステップA5-2）。

【0094】エバネッセント波の波数は回折格子面への照射光の入射角度に変化することから、反射光強度の変化量も入射角度により変化し、入射角度如何によっては変化量が大きくなりすぎて分析部14に含まれる測定器の測定レンジを越えてしまう場合がある。この場合、従来は、光学系の再調整により入射角度を変更する必要があった。特に多項目測定を行う場合において、検出種間の濃度差が大きい場合には、測定しようとする検出種毎に入射角度を変更しなければならなかった。しかしながら、本実施形態のセンサチップ1には、溝ピッチが異なる複数の領域（回折格子面）51～54が設けられているので、照射光の入射角度を変更せずとも別の領域（回折格子面）を選定することで実質的に入射角を変更したことになる。つまり、実質的に計測レンジを拡大したことに相当する。その結果、広い計測レンジが必要となる濃度域の広い試料についても対応することが可能となる。

【0095】このような手法により分析を行うことで、従来の方法のように光学系の再調整等の煩雑な操作の必要がなく、且つ、従来の角度変化型に比較して簡単な装置構成、特に、簡単な光学系により試料の分析が可能になる。なお、上記の各ステップA1～A5は、上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、試料中の検出種が結合物質6、7に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることが可能になる。

【0096】なお、ここでは単一波長の光を単一の角度（固定角度）で照射する方法について説明したが、単一波長の光を照射角度を変化させながら照射する方法にも本実施形態にかかるセンサチップ1を用いることができる。この方法では、反射光強度に基づき共鳴現象が生じる溝ピッチを計測（または補間計算）し、共鳴現象が生じる溝ピッチ、及び共鳴現象が検出された位置における反射光の強度（実際には、反射光強度から測定された共鳴角）に基づき、別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）から試料中の検出種の濃度を分析する。

【0097】また、ここでは光源12として単色光を用いる場合について説明したが、白色光を光源12に用いる場合には、図3に示すように計測レンジ（ $\omega 1 \sim \omega 2$ ）内にある全ての共鳴ポイントP11、P21、P42を一度に検出することができる。したがって、結合物

質6に対応する検出種の濃度は、共鳴ポイントP11に対応する溝ピッチd1及び共鳴現象が検出された位置（領域51）における反射光の強度（実際には、反射光強度から測定された共鳴波長）に基づき、或いは、共鳴ポイントP21に対応する溝ピッチd2及び共鳴現象が検出された位置（領域52）における反射光の強度に基づき、別途測定して得られた検量線（或いは理論的な濃度換算式）から、分析することができる。一方、結合物質7に対応する検出種の濃度は、共鳴ポイントP42に対応する溝ピッチd4及び共鳴現象が検出された位置（領域54）における反射光の強度に基づき、分析することができる。

【0098】（B）第2実施形態

次に、図7（a）を用いて本発明の第2実施形態を説明する。なお、第1実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態にかかるセンサチップ61は、第1実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面（センサ面）61aを金属層3により被覆され、金属層3上に回折格子5が形成されている。

【0099】ここでは、溝ピッチの異なった領域51、52、53、54の一部には回折格子5が形成されていない領域（以下、非回折面という）51x、52x、53x、54xがそれぞれ形成されている。その他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0100】この構造によれば、センサチップ61からの反射光は、回折格子5が形成された面である領域51～54で反射して表面プラズモン共鳴により強度を弱められた反射光（以下、共鳴反射光という）と、非回折面51x～54xで反射し、表面プラズモン共鳴の影響を受けていない反射光（以下、基準反射光という）とに別けられる。

【0101】このような特性により、本実施形態のセンサチップ61を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、計測される共鳴反射光の強度を、共鳴反射光が反射した回折格子面と同じ回折格子面にある非回折面で反射した基準反射光の強度で補正するステップを備えることができる。これにより、第1実施形態と同様の利点に加えて、基準反射光の強度を考慮した補正によって、各回折格子面間の表面特性による誤差の影響を補正することができ、より正確な分析を行うことが可能となるという利点がある。

【0102】図7（b）を用いて詳しく説明する。図7（b）は、センサチップ61の表面構造と反射光強度との関係を模式的に示した概要図である。

【0103】上述したように、センサチップ61表面には異なる溝ピッチの回折格子を形成された領域51～54が存在しており、これらの領域51～54はそれぞれ表面特性が異なっている。この表面特性の相異はセンサチップの製造段階に起因する微小なものが主であるが、

微小であってもセンサチップから反射してくる反射光の強度に影響を及ぼす。したがって、その領域51～54から反射する反射光も異なったものになる。

【0104】本発明のセンサチップ61の目的は、センサチップ61表面に存在する試料を表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴を利用して分析することであるため、試料の性質によらずセンサチップ61の表面特性の違いによって反射光にばらつきが生じることは好ましくない。

【0105】したがって、本実施形態では各領域51～54にある、回折格子の存在しない領域51x～54xからの反射光の強度を用いて、各領域51～54からの反射光の強度をそれぞれ補正している。例えば図7

(b)においては、領域51からの反射光の強度と領域51xからの反射光の強度との差を、表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴により減少した反射光の強度であるとしている。この様な補正を行うことで、より正確な分析が可能となるのである。

【0106】(C)第3実施形態

次に、図8を用いて本発明の第3実施形態を説明する。なお、第1、第2実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態にかかるセンサチップ71は、第1実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面(センサ面)71aを金属層3により被覆され、金属層3上に回折格子5が形成された領域51～54が設けられている。

【0107】ここでは、領域51～54上に、結合物質6の他に非結合物質91を固定化する。非結合物質91は、検出すべき検出種と特異的に結合しうる性質を備えない物質であり、検出すべき検出種(化学種、生化学種又は生物種等)に応じた非結合物質91が選択される。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質6及び非結合物質91がそれぞれ選択されて、それぞれ別々の領域51～54に固定化される。したがって、結合物質6が固定化された領域は反応領域となり、非結合物質91が固定化された領域及び結合物質6と非結合物質91とが共に固定化されていない領域は非反応領域となる。また、金属層3を形成する金属と検出種とが特異的に結合しない場合には、非結合物質91を固定化せずに、結合物質6及び非結合物質91が共に固定化されず金属層3が剥き出しとなっている領域を非反応領域としても良い。その他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0108】この構造によれば、領域51～54から反射される反射光は、反応領域で反射される反射光と非反応領域で反射される反射光とに別けられる。反応領域で反射される反射光は試料の定量的及び／又は定性的な要素によって変化するが、非反応領域で反射される反射光は試料の影響を受けず回折格子面の構造によってのみ強度が決定される。

【0109】このような特性により、本実施形態のセンサチップ71を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、反応領域及び非反応領域のそれぞれにおいて表面プラズモン共鳴が発生する溝ピッチを特定するステップと、さらに、反応領域及び非反応領域の溝ピッチに基づき分析をするステップとを行う。これにより、検出種が反応領域で結合物質と結合した時の反射光を、反応領域近傍の非反応領域で反射した反射光を基準として分析することができるため、第1実施形態と同様の利点に加えて、検出種が結合物質と特異的に結合することにより生じる変化を確実に分析することができる。

【0110】(D)第4実施形態

次に、図9を用いて本発明の第4実施形態を説明する。なお、第1～第3実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態は、第1実施形態の分析装置10の、試料流体が流れる流路11aの上流に、試料流体を分離する分離装置92が設置された構造となっている。

【0111】分離装置92としては、試料の吸着性や分配係数に応じて分離を行う液体クロマトグラフィーやHPLC (high performance liquid chromatography)、試料の電気陰性度に応じて分離を行うキャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動、マイクロチャネル或いはフローインジェクションなどが好適であるが、もちろんこの他の装置を分離装置として分析装置に取り付けても良い。

【0112】マイクロチャネルは何らかのチップ表面に形成された試料が流れる溝のことであるが、この溝の一部にHPLCのカラム充填材に相当するものを詰めたり、溝表面に官能基を備えさせたりすることで、分離が可能となるものである。

【0113】また、フローインジェクションは試料が流れている状態で様々な反応を起こさせる手法であるが、例えば錯形成反応と溶媒抽出とを行い、試料中の検出種以外の物質を除去する等の処理をして、分離を行うことができる。

【0114】なお、もちろん上記以外の装置を分離装置として分析装置に取り付けても良い。

【0115】この装置を用いて分析を行う場合、酵素やたんぱく質等の検出種を予め分離装置によって純粋な物質ごとに分離することができる。このため、純粋な物質となった検出種を分析することができ、より正確な分析を行うことができる。

【0116】また、分析手段として通常用いられている検出方法(吸光度検出、蛍光検出、化学発光検出、示差屈折計検出、電気化学検出など)と組み合わせることにより、各種の存在物質の存在量と、その中での検出対象種の特異的反応計測による測定とを同時に行うことができる。

【0117】(E)第5実施形態

次に、図6を用いて本発明の第5実施形態を説明する。なお、第1～第4実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態は、第1実施形態と基本的な構成は共通しており、光源12から照射された光はセンサチップで反射し、光検出部13で検出されるよう構成されている。

【0118】ここでは、検出種は蛍光や燐光などの光を発生しうる発光物質である。例えば、結合物質と反応することや、光源12から供給される光によって励起されることにより発光する発光物質がある。本実施形態では光検出部13がこの発光した光（発光光）を検出できるように構成されている。

【0119】このような構成により、第1実施形態の利点に加え、本実施形態は発光光の検出結果を用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うことができ、したがってより正確な分析を行うことができる。特に蛍光などの化学発光は非常に高感度であるため、微小な反応を検出することが可能である。

【0120】(F)第6実施形態

次に、図10、図11を用いて本発明の第6実施形態を説明する。なお、第1～第5実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態は、第1実施形態と基本的な構成は共通しており、分析装置は光源12から照射された光はセンサチップ81で反射し、光検出部13で検出されるよう構成されている。またセンサチップ81は、第1実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面（センサ面）81aを金属層3により被覆され、金属層3上に回折格子5が形成された領域51、52、53、54が設けられている。

【0121】ここでは、図10に示すように、試料が流れる流路80が回折格子5が形成されている方向と直交する向きに複数設けられている。流路80はセンサチップ81表面を覆う蓋86とセンサチップ81との間に設けられ、ともにセンサチップ上の各領域51～54を通過するよう形成されている。なお、流路80と流路80との間には、試料が混ざらないようにシールが施されている。また、図11に示すように、分析装置10の流路80の上流に、異なる試料流体それぞれを各流路80に割り当てて、割り当てた試料流体を各流路に導入する試料導入装置87が設置されている。

【0122】このような特性により、本実施形態のセンサチップ81を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、異なる複数の試料を各流路に割り当て、割り当てた流路に試料を流してセンサ面に光を照射するステップを行うことができ、また、第1実施形態と同様の分析を流路毎に行うことができる。

【0123】この様な構成により、第1実施形態の利点に加え、本実施形態は複数の検出種を同時に分析するこ

とができるため作業を効率的に行うことができる。また、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することが可能となる。

【0124】詳しく説明する。センサチップ81の正面図を図12に示す。図12(a)に示すように、センサチップ81表面に形成された回折格子5は、溝に垂直な方向に連続する4つの領域（回折格子面）G1、G2、G3、G4毎に溝ピッチが異なっている。

【0125】このセンサチップ81表面には、溝に垂直な方向に形成されたm本の流路P1、P2、・・・Pmが形成されている。流路P1、P2、・・・Pm上には、溝ピッチの異なる領域G1、G2、G3、G4それぞれに結合物質6がスポット上に固定化されている。

【0126】従来例と比較して実施形態の効果を説明する。図12(b)に示す従来例では、溝ピッチが均一な回折格子を形成されたセンサチップが表面に試料を流すためのm本の流路P1、P2、・・・Pmを備えていた場合、分析できる検出種の種類の最大数は形成された流路の数と同じm種類であった。また従来のセンサチップにおいては計測レンジが狭いため、光を照射したときに共鳴ポイントが計測レンジ内に無い時や、さらに多くの共鳴ポイントを検出したい時には、入射光の波長を変えたり入射角度を変えたりする必要があった。

【0127】しかし本願発明のセンサチップ81においては、分析可能な検出種の種類の最大数は従来例と同じくm種類であり、そのうえ、溝ピッチに応じて入射光の波長や入射角度を変更することなく共鳴ポイントを検出したり、溝ピッチに応じた広い計測レンジの共鳴ポイントを検出したりすることができるのである。

【0128】さて、複数の溝ピッチと複数の流路とをともに形成することで、上述のような利点をもつセンサチップを得ることができるのであるが、結合物質の配置を変化させることでさらに優れた利点を得ることができる。以下、例を示してさらに詳しく説明する。なお、以下の各例においては、領域の種類の数及び固定化した結合物質の組み合わせ以外は前述した第6実施形態の構成と同一の構成をとっている。

【0129】(例6-1)入射光の入射角度を変化させながら、反射光の角度を検出する場合について説明する。図13(a)に示すように、溝ピッチが異なる2つの領域、即ち低角度検出部G1と高角度検出部G2とをもつセンサチップ94において、2つの領域それぞれに対してn種類の結合物質S1、S2、・・・Snを固定化する。このとき、結合物質と検出種との反応を広い計測レンジで分析するという目的のために、各領域における結合物質S1、S2、・・・Snの組み合わせは同一流路上では同じにする。

【0130】したがって、検出可能な検出種と結合物質との組み合わせはm×n通りとなり、一つのセンサチップ94で多くの検出種についての分析が可能となる。その

うえ低角度検出部G1及び高角度検出部G2の2つの計測レンジで計測を行えるため、従来よりも広い計測レンジでの計測ができる。

【0131】なお、このときどの流路P1, P2, …, Pmのどの領域G1, G2にどの結合物質S1, S2, …, Snを固定化させるかは、分析する検出種に応じて任意に決定することができる。

【0132】(例6-2)入射光の入射角度を変化させながら、反射光の角度を検出する場合について説明する。図13(b)に示すように、センサチップ95に溝ピッチが異なる領域G1, G2, …, Giを多数設けて、各領域G1, G2, …, Giに複数種の結合物質S1, S2, …, Snをn箇所固定化する。

【0133】これにより、領域の種類の数iに応じてさらに広い計測レンジで共鳴ポイントを検出することが可能となる。結合物質S1, S2, …, Snの種類は、例6-1のように各領域G1, G2, …, Giで同一としても良いし、領域にかかわらず任意としても良い。結合物質S1, S2, …, Snの種類を各領域G1, G2, …, Giで同一とした場合は、例6-1と同様に、結合物質S1, S2, …, Snと検出種との複数の反応をより広い計測レンジで計測できる。一方結合物質S1, S2, …, Snの種類を各領域G1, G2, …, Giで異なるのとした場合には、予め反応の程度が分かっている結合物質S1, S2, …, Snと検出種との複数の反応などを、一度に分析することができる。

【0134】また、例6-1と同様に、どの流路P1, P2, …, Pmのどの領域G1, G2, …, Giにどの結合物質S1, S2, …, Snを固定化させるかは、分析する検出種に応じて任意に決定することができる。

【0135】(例6-3)入射光の入射角を固定し、反射光の強度を検出する場合について説明する。図13(c)に示すように、溝ピッチが異なる領域G1, G2, …, Giが複数設けられたセンサチップ96の各領域G1, G2, …, Giに、n種類の結合物質S1, S2, …, Snを固定化する。このとき、結合物質S1, S2, …, Snと検出種との反応を広い計測レンジで分析するという目的のために、各領域G1, G2, …, Giにおける結合物質S1, S2, …, Snの種類の組み合わせは同一流路上では同じにする。

【0136】これにより、入射光の入射角度を変化させることなく、広い計測レンジの結合物質S1, S2, …, Snと検出種との反応を分析することができる。したがって、例6-1と同様に複数の検出種を分析できる上、入射光の入射角度を変化させる時間が必要なく、時間分解能に優れた観測を行うことができる。

【0137】また、例6-1, 6-2と同様に、どの流路P1, P2, …, Pのどの領域G1, G2, …, Gi

Giに結合物質S1, S2, …, Snを固定化させるかは、分析する検出種に応じて任意に決定することができる。

【0138】(G)第7実施形態

次に、センサチップ表面の拡大図である図14を用いて本発明の第7実施形態を説明する。なお、第1～第6実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態は、第1実施形態と同一の分析装置10及び同一のセンサチップを用いた構造を持っている。

【0139】ここでは、図14(a)に示すように、結合物質6, 7のスポットが溝ピッチの異なる領域51, 52及び53, 54の境目に固定化されている。

【0140】これにより、固定化する結合物質6, 7のスポット数を少なくして、分析を行うことができ、ひいてはセンサチップの小型化や1回の検出で検出できる反応の増加を促進することができる。

【0141】詳しく説明する。図14(b)に示す従来例のように、結合物質6, 7のスポットが各領域51～54それぞれの内部に収まるように固定化されている場合には、領域51～54の数と同数の結合物質6, 7のスポットを、結合物質6, 7の種類ごとに固定化しなくてはならず、また、各スポットにつき1個の検出領域93しか設けられなかった。なお、ここでいう検出領域93とは、光検出される反射光が反射する領域のことであり、図14では四角形となっているが円形等の形状でも良く、その形状は任意に決められる。

【0142】しかし、図14(a)に示すように、溝ピッチの異なる領域51, 52及び53, 54の境目に結合物質6, 7のスポットを固定化すると、各スポット内において、溝ピッチの異なる一方の領域側と他方の領域側とに検出領域を設けることができる。したがって、1個のスポットにつき2種類の計測レンジで計測をすることができる。

【0143】また、結合物質を固定化する位置は、溝ピッチが異なる2種類の領域の境目に限定されるものではなく、溝ピッチが異なる領域の境目であれば何種類の領域の境目であってもよい。たとえば図14(c)に示すように、溝ピッチの異なる4種類の領域51～54の境目が十字型になるように回折格子が形成されているセンサチップにおいては、境目が形成する十字型の中心に結合物質6, 7のスポットが位置するように固定化すれば、結合物質6, 7のスポットと各領域51～54とが重なる領域それぞれに検出領域93を設けることができる。したがって、1個のスポットにつき4種類の計測レンジで計測を行うことができる。

【0144】(H)第8実施形態

次に、図11, 15を用いて本発明の第8実施形態を説明する。なお、第1～第7実施形態と実質同一部分には同一符号を付して説明する。本実施形態は、第1実施形

態と基本的な構成は共通しており、分析装置は光源12から照射された光はセンサチップ100で反射し、光検出部13で検出されるよう構成されている。またセンサチップ100は、第1実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面(センサ面)81aを金属層3により被覆され、金属層3上に回折格子5が形成された領域51, 52, 53, 54が設けられている。

【0145】ここでは、図15に示すように、試料が流れる流路80が回折格子5が形成されている方向と直交する向きに複数設けられている。流路80はセンサチップ100表面を覆う蓋86とセンサチップ100との間に設けられ、ともにセンサチップ上の各領域51~54を通過するよう形成されている。なお、流路80と流路80との間には、試料が混ざらないようにシールが施されている。

【0146】また、流路80上の各領域51~54には、結合物質6と非結合物質91とが固定してある。非結合物質91は、検出すべき検出種と特異的に結合する性質を備えない物質であり、検出すべき検出種(化学種、生化学種又は生物種等)に応じた非結合物質91が選択される。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質6及び非結合物質91がそれぞれ選択されて、それぞれ別々の領域51~54に固定化される。したがって、結合物質6が固定化された領域は反応領域となり、非結合物質91が固定化された領域及び結合物質6と非結合物質91とが共に固定化されていない領域は非反応領域となる。また、金属層3を形成する金属と検出種とが特異的に結合しない場合には、非結合物質91を固定化せずに、結合物質6及び非結合物質91が共に固定化されず金属層3が剥き出しとなっている領域を非反応領域としても良い。

【0147】さらに、図11に示すように、分析装置10の流路80の上流に、異なる試料流体それぞれを各流路80に割り当てて、割り当てた試料流体を各流路に導入する試料導入装置87が設置されている。この他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0148】この構造によれば、領域51~54から反射される反射光は、反応領域で反射される反射光と非反応領域で反射される反射光とに別けられる。反応領域で反射される反射光は試料の定量的及び／又は定性的な要素によって変化するが、非反応領域で反射される反射光は試料の影響を受けず回折格子面の構造によってのみ強度が決定される。

【0149】このような特性により、本実施形態のセンサチップ100を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、異なる複数の試料を各流路に割り当て、割り当てた流路に試料を流してセンサ面に光を照射するステップと、流路毎に反応領域及び非反応領域のそれぞれにおいて表面プラズモン共鳴が発生

する溝ピッチを特定するステップと、さらに、流路毎に反応領域及び非反応領域の溝ピッチに基づき分析をするステップとを行う。

【0150】これにより、検出種が反応領域で結合物質と結合した時の反射光を、反応領域近傍の非反応領域で反射した反射光を基準として分析することができるため、第1実施形態と同様の利点に加えて、第3実施形態と同様に、検出種が結合物質と特異的に結合することにより生じる変化を確実に分析することができる。また、第6実施形態と同様に、複数の検出種を同時に分析することができるため作業を効率的に行うことができ、複数の検出種を同じ条件下で分析できるため、検出種の違いを明確に分析することが可能となる。

【0151】(I)第9実施形態

次に、図16を用いて本発明の第9実施形態にかかるセンサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)21の構成について説明する。本実施形態にかかるセンサチップ21は、第1実施形態と同様その基本構成は従来のセンサチップと共通しており、表面(センサ面)21aを金属層23により被覆され、金属層23上に回折格子25が形成されている。本実施形態では、回折格子25は連続的な溝ピッチの分布を持って形成されている。具体的には、図17は図16中の矢印X方向における溝ピッチを示したものであるが、図17中に実線で示すように隣接する溝間で溝ピッチが滑らかに変化するように回折格子25が形成されている。なお、図17中の一点鎖線は第1実施形態のセンサチップにおける溝ピッチの変化を示したものであり、二点鎖線は従来のセンサチップにおける溝ピッチの変化を示したものである。

【0152】光の照射により回折格子25で発生するエバネッセント波の波数は、数2に示すように回折格子25の格子定数に依存し、この格子定数は回折格子25の溝ピッチに依存することから、上記のような構造によれば、一定の波数の照射光に対して連続的な波数の分布を有するエバネッセント波を得ることができる。この場合、表面プラズモン波、エバネッセント波それぞれの角振動数 ω と波数 k との関係を示す分散関係図は図18に示すようになる。

【0153】図18において、符号Cで示す帯域が回折格子25全体で発生するエバネッセント波の角振動数 ω と波数 k との関係を示しており、これは入射光の角振動数 ω と波数 k との関係を示す直線B0に平行な直線の集合である。そして、ここでは、曲線A1, A2が帯域Cに重なる範囲である線分S1S2, S3S4が、表面プラズモン共鳴が起きる範囲を示している。

【0154】このように表面プラズモン共鳴が起きる範囲が連続的に存在することにより、単波長の光を一定の入射角度で照射した場合でも回折格子25上の何れかの位置において共鳴現象が発生する。例えば図18において、ある角振動数 ω_x の光を照射した場合、曲線A1上

の角振動数 ω の点 P_x が、共鳴現象が起きる共鳴ポイントとなる。この共鳴ポイント P_x を通るエバネッセント波（直線 B_x で示す）が、曲線 A_1 で示す表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波である。そして、この直線 B_x に対応する溝ピッチを与える回折格子25上の位置が、実際に共鳴現象が起きている位置である。

【0155】本実施形態にかかるセンサチップ21によれば、回折格子25上の何れかの位置において共鳴現象が発生するので、共鳴現象が発生する溝ピッチを求めるにあたり第1実施形態のような近似や補間計算を用いる必要がない。したがって、図6の分析装置を用いて試料の分析を行う場合には、反射光の強度から共鳴現象が発生している位置を検出し、その位置における溝ピッチ（波長変化型の場合は、さらに反射光強度から測定された共鳴波長、角度変化型の場合は、さらに反射光強度から測定された共鳴角度）を検量線に照合するだけでよく、より簡単に且つより正確に試料中の検出種の濃度を分析することが可能になる。

【0156】（J）第10実施形態

次に、図19を用いて本発明の第10実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）31の構成について説明する。本実施形態にかかるセンサチップ31は、従来同様に表面（センサ面）31aを金属層33により被覆されて金属層33上に回折格子35が形成されたものであるが、ここでは金属層33上に複数の測定領域38a～38dが離散的に設けられ、これら測定領域38a～38d毎に回折格子35が形成されている。

【0157】各測定領域38a～38dに形成された回折格子35は、溝ピッチは同一であるが、溝方向が全て異なっている。すなわち、測定領域38aにおける回折格子35の溝方向を基準としたとき、測定領域38bでの溝方向は θ_2 だけ傾き、測定領域38cでの溝方向は θ_3 だけ傾き、測定領域38dでの溝方向は θ_4 だけ傾いている。このため、測定領域38aでの溝方向と垂直な方向から見たときには、測定領域38aでの溝ピッチは d_1 であるのに対し、測定領域38bでの実質的な溝ピッチ d_2 は $d_1 / \cos \theta_2$ 、測定領域38cでの実質的な溝ピッチ d_3 は $d_1 / \cos \theta_3$ 、測定領域38dでの実質的な溝ピッチ d_4 は $d_1 / \cos \theta_4$ となる。傾斜角度間の大小関係を $\theta_2 < \theta_3 < \theta_4$ とすると、実質的な溝ピッチ間の大小関係は $d_1 < d_2 < d_3 < d_4$ となり、測定領域38a～38d毎に実質的な溝ピッチが異なることになる。

【0158】したがって、本実施形態にかかるセンサチップ31によれば、特定の一方向から光を照射すれば、各測定領域38a～38dにおいてその光の照射方向に対する実質的な溝ピッチに応じた波数のエバネッセント波が生じ、これにより表面プラズモン波とエバネッセント波とが共鳴する共鳴ポイントにも分布が生じるので、

第1実施形態と同様、計測レンジに制約がある場合でも広範囲の屈折率分布を有する試料の分析に対応することができる。

【0159】（J）その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、上述の実施形態はあくまでも本発明の一実施形態であり、本発明の実施形態がこれに限定されるものではない。例えば、第1実施形態の変形例（図5参照）では、離散的に配置された各領域51～54の溝方向を同一にしていたが、図20に示すセンサチップ1"のように一部の領域54の溝方向が他の領域51～53と異なっていたり、或いは全ての領域51～54の溝方向が異なっていたりしてもよい。この場合、領域51～54毎に光の照射方向を変えて溝方向に垂直に光を照射すれば、第1実施形態と同様の作用効果が得られる。

【0160】また、図21に示すように溝ピッチが異なる複数のセンサチップ41A～41Dを用意し、これらを一つのセンサチップ41として使用することによっても、第1実施形態と同様の作用効果が得られる。さらに、上述の実施形態では、従来の一般的な構造の回折格子型センサチップを用いた場合について説明したが、本発明は他の様々な構造の回折格子型センサチップを用いても実施することができる。すなわち、試料と接するセンサ面と、センサ面の近傍に設けられ表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、センサ面の近傍に設けられ照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子とを備えたセンサチップであれば、本発明を適用することができる。

【0161】また、上述した実施形態は必ずしも単独で実施する必要は無く、各実施形態を組み合わせても良い。また、溝ピッチの異なる領域に固定化する結合物質の種類は、必要に応じて任意に決めることができる。

【0162】また、各実施形態を組み合わせても実施することも可能である。例えば、第2実施形態と第4実施形態とを組み合わせても良い。

【0163】特に、第2実施形態と第3実施形態とを組み合わせ、非回折面による補正と非反応領域による補正とを共に行なようにすることは、正確な分析をより確実に行うことができるため好ましい。即ち、反応領域からの反射光に対し非回折面による補正を行って共鳴角を算出し、さらに、非反応領域からの反射光に対し非回折面による補正を行って共鳴角を算出して、両者の共鳴角から真の特異的反応に由来する共鳴角シフト量と検出種濃度とを算出することができるのである。

【0164】また、第3実施形態においては、非結合物質としては検出種と特異的反応を起こさない性質を持つ物質を、検出種に応じて選択する場合と、検出種に関係なく同一の物質を使う場合がある。

【0165】全ての検出種に対して同一の物質を非反応

物質として用いる場合には、例えばブロッキング剤として使用されているBSA (bovine serum albumin) や、ゼラチンなどを使用することができる。

【0166】以上例を挙げたように、本発明はその趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。

【0167】

【実施例】以下に本発明を実施例を用いて説明するが、その要旨の範囲を越えない限り本発明は実施例に限定されるものではない。

【0168】(実施例1) 平板状のポリカーボネート製の基体の表面に凹凸形状を形成し、この凹凸形状を回折格子とし、さらに基体の表面に厚さ80 nmで金を蒸着して、センサチップを作成した。

【0169】このセンサチップには、それぞれ溝方向に2.5 mmずつ溝ピッチ(TP)が846 nm, 856 nm, 870 nm, 876 nmの回折格子が形成された領域を設けた。このセンサチップを用いて、入射光の角度を19.89°～21.18°で変化させながら、SPR測定装置FLEX CHIPSTTM Kinetic Analysis System (HTS Biosystems Inc.) を使って反射光の強度を計測した。試料としては純水及び1%エタノール水溶液及び10%エタノール水溶液及び30%エタノール水溶液を用い、これらを順にセンサチップ表面に導入して計測を行った。なお、計測時の水温は30℃、入射光の波長は870 nmであった。

【0170】溝ピッチ(TP)が846 nm, 856 nm, 870 nm, 876 nmの領域における計測結果を図22のグラフに示す。横軸は測定からの経過時間であり、縦軸は共鳴角度である。時間0秒から約1200秒

までが純水、約1200秒から1400秒までが1%エタノール水溶液、約1400秒から約1720秒までは10%エタノール水溶液、約1720秒から約2140秒までは30%エタノール水溶液、約2140秒以降は純水のデータをそれぞれ表わしている。

【0171】溝ピッチが870 nmのグラフをみると、1%エタノール溶液の共鳴角度及び10%エタノール溶液の共鳴角度の、純水の共鳴角度に対する変化量を測定することができる。しかし、30%エタノール水溶液のグラフは計測レンジの外に出ているため、溝ピッチが870 nmのグラフからは30%エタノール水溶液の変化量を測定することができない。

【0172】ところが、溝ピッチが856 nmのグラフを調べてみると、10%エタノール水溶液及び30%エタノール水溶液のデータが計測されている。したがって、溝ピークが856 nmのグラフから、30%エタノール水溶液の10%エタノール水溶液に対する反射光の強度変化量を用いて補正を行うことで、30%エタノール水溶液の純水に対する反射光の強度変化量を測定することができる。即ち、30%エタノール水溶液の10%エタノール水溶液に対する反射光の強度変化量と、10%エタノール水溶液の純水に対する反射光の強度変化量との和を算出することで、30%エタノール水溶液の純水に対する反射光の強度変化量を測定することができるのである。

【0173】こうして測定された各濃度のエタノール水溶液の、純水に対する反射光強度の変化量を表1に示す。

【表1】

エタノール濃度	純水に対する共鳴角の変化量
1%	33mdeg
10%	362mdeg
30%	1143mdeg (10%エタノール水溶液の純水に対する共鳴角の変化量362mdeg+30%エタノール水溶液の10%EtOHに対する共鳴角の変化量781mdeg)

表1のデータをグラフとし、図23に示した。図23から、エタノール濃度と純水に対する試料の反射光強度の変化量との線形性が確認できる。

【0174】以上のことから、溝ピッチの異なる回折格子を形成された領域を設けたセンサチップを用いることによって、入射光の入射角度を大きく変化させなくても従来よりも広い計測レンジの反射光強度を計測でき、時間分解能の優れた分析を行うことができることが確認できた。

【0175】(実施例2) 実施例1と同様に、それぞれ溝方向に直交する方向に2.5 mmずつ溝ピッチ(TP)が846 nm, 856 nm, 870 nm, 876 nmの領域を設けたセンサチップを用いて、試料に入射角

度を固定した光を照射したときの反射光強度を計測した。計測にはSPR測定装置FLEX CHIPSTTM Kinetic Analysis Systemを用いて行い、試料は純水と10%エタノール水溶液を用いた。また、計測時の温度は30℃、入射光の波長は875 nm、入射光の入射角度は20.8502°であった。

【0176】結果を図24(a)のグラフに示す。この結果から、6次の多項式を用いて純水及び10%エタノール水溶液の共鳴が生じた回折格子の溝ピッチを求めた。多項式を用いた近似の手法を図24(b)に示し、その結果を表2に示す。

【0177】

【表2】

エタノール濃度	溝ピッチ	純水に対する溝ピッチの変化量
0% (純水)	871.72nm	0nm
10%	863.30nm	8.42nm

【0178】表2から、純水のグラフと10%エタノール水溶液のグラフとは、反射光の強度が極少となる溝ピッチが異なっていることが分かった。この溝ピッチの差、即ち、溝ピッチの変化量によって、試料の分析を行うことができる。

【0179】以上のことから、本発明のセンサチップを用いることにより、入射光の入射角度を固定した状態でもSPRセンサチップにより分析を行うことができることが確認できた。なお、今回は溝ピッチの異なる領域を4種類だけ用いたが、さらに多種の溝ピッチを有する領域を用いることで、さらに精密な分析が可能となると考えられる。

【0180】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、光の照射方向に対する回折格子の実質的な溝ピッチに分布が存在することにより、回折により生じるエバネッセント波の波数と角振動数との関係にも実質的な溝ピッチに応じた分布が生じ、これにより一の表面プラズモン波に対して角振動数の異なる複数の共鳴ポイントにおいて共鳴現象が生じるので、誘電率分布や屈折率分布が広範囲な場合でも、光学系の再調整を行うことなく試料の分析を行うことができる。また、本発明によれば、簡単な光学系により単波長の光源を用い、一定角度で試料の分析を行うことができる。

【0181】また、本発明によれば、簡単な光学系により試料の分析を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のセンサチップの第1実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図2】図1のセンサチップに結合物質を固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図3】図1のセンサチップの光学的特性を示す分散関係図である。

【図4】図1のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図5】図1のセンサチップの変形例を示す模式的な斜視図である。

【図6】本発明の分析装置の一実施形態を示す模式的な模式図である。

【図7】(a)は本発明のセンサチップの第2実施形態を示す模式的な斜視図、(b)は本発明のセンサチップを説明するための概要図である。

【図8】本発明のセンサチップの第3実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図9】本発明の分析装置の第4実施形態を示す模式的な模式図である。

【図10】本発明のセンサチップの第5実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図11】本発明の分析装置の第5実施形態を示す模式的な模式図である。

【図12】本発明のセンサチップの第6実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図13】本発明のセンサチップの第6実施形態を説明するための模式的な概要図である。

【図14】本発明のセンサチップの第7実施形態を示す模式的な平面図である。

【図15】本発明のセンサチップの第8実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図16】本発明のセンサチップの第9実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図17】図16のセンサチップにおける溝ピッチの分布を示す図である。

【図18】図16のセンサチップの光学的特性を示す分散関係図である。

【図19】本発明のセンサチップの第10実施形態を示す平面図である。

【図20】図5に示すセンサチップの変形例を示す模式的な斜視図である。

【図21】本発明のセンサチップの別実施形態を示す模式的な斜視図である。

【図22】実施例1の結果を示すグラフである。

【図23】実施例1の結果を示すグラフである。

【図24】実施例2の結果を示すグラフである。

【図25】従来のセンサチップの特性を示す分散関係図である。

【図26】(a)は従来の角度変化型の分析装置の光学系を示す模式図であり、(b)はセンサチップへの光の照射状態を拡大して示す図である。

【符号の説明】

1, 1', 1'', 21, 31, 41, 61, 71, 81, 94, 95, 96, 100 センサチップ (表面プラズモン共鳴センサチップ)

1a, 21a, 31a, 61a, 71a, 81a センサ面

2 基体

3, 23, 33 金属層

4 凹凸形状

5, 25, 35 回折格子

6, 7, S1, S2...Sn 結合物質

10 分析装置

11 ホルダ

11a, 80, P1, P2...Pm 流路

12 光源

13 光検出器

14 分析部

38a~38d, 51~54, G1, G2...Gi

測定領域(連続領域)

86 蓋

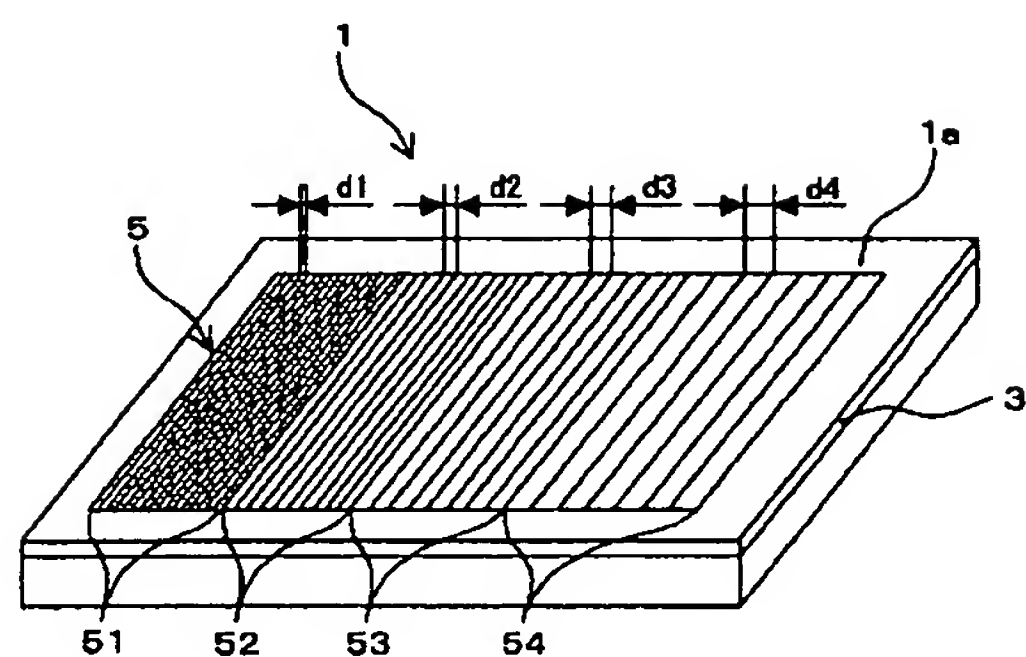
87 試料導入装置

91 非結合物質

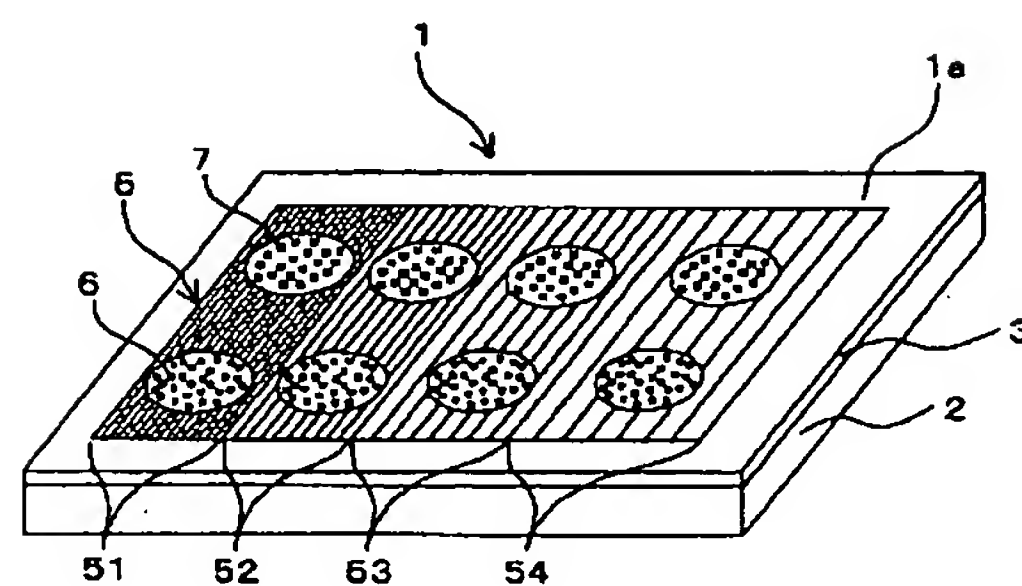
92 分離装置

93 検出領域

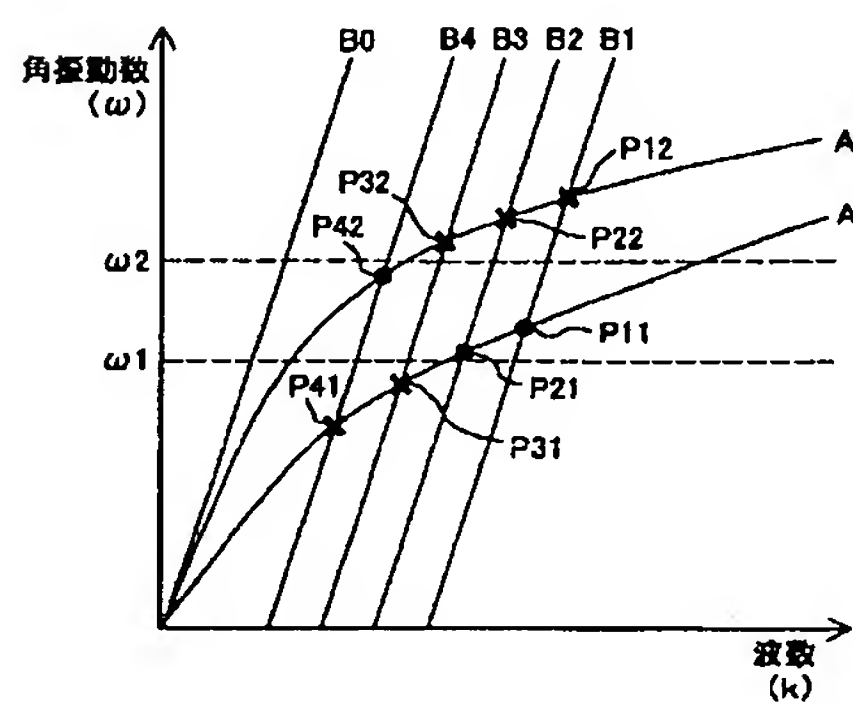
【図1】



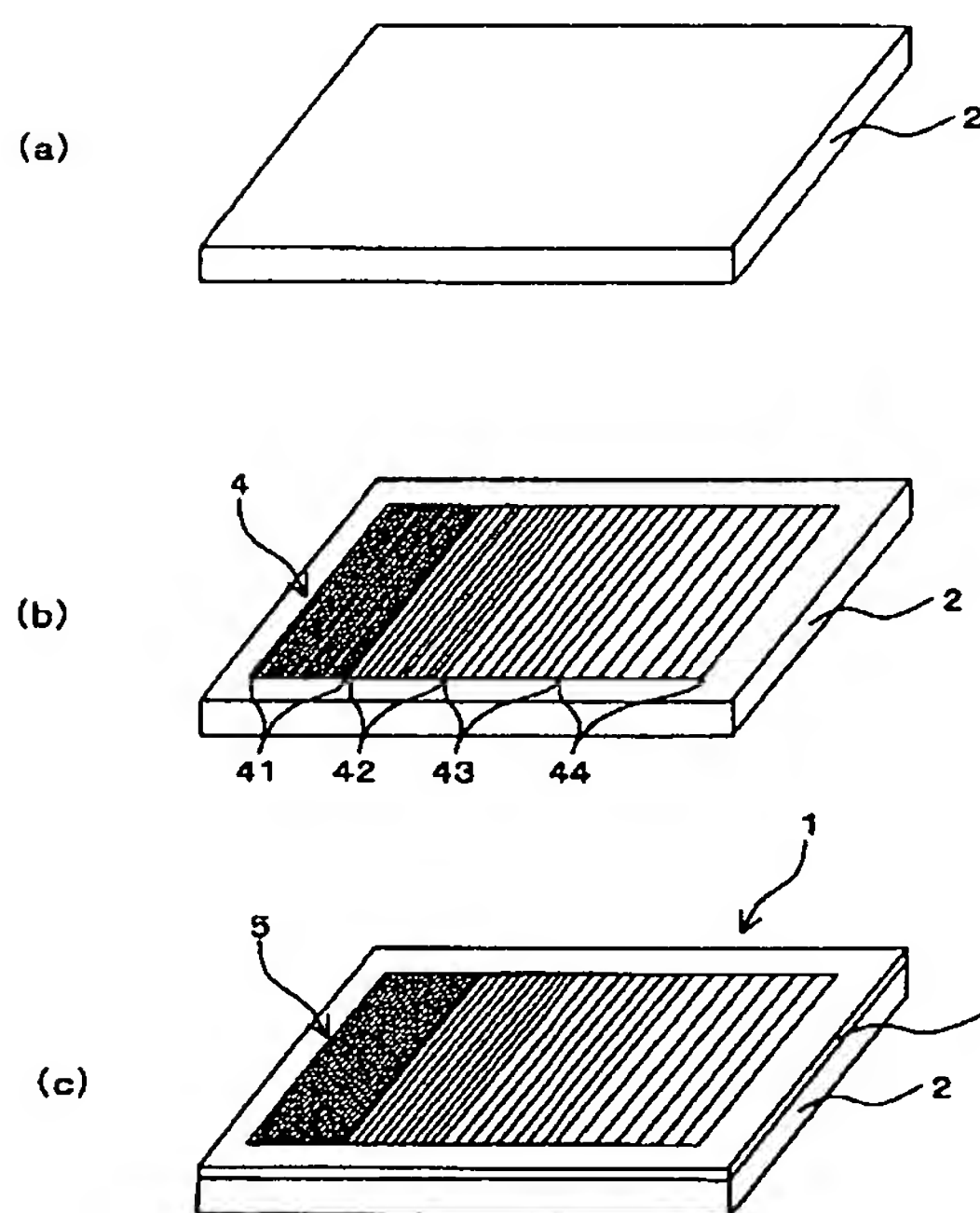
【図2】



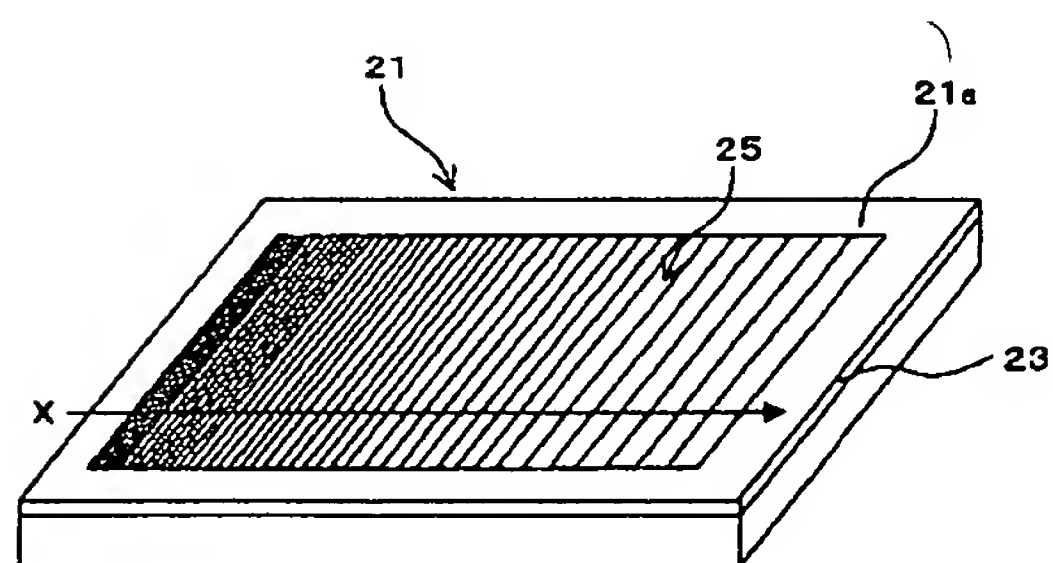
【図3】



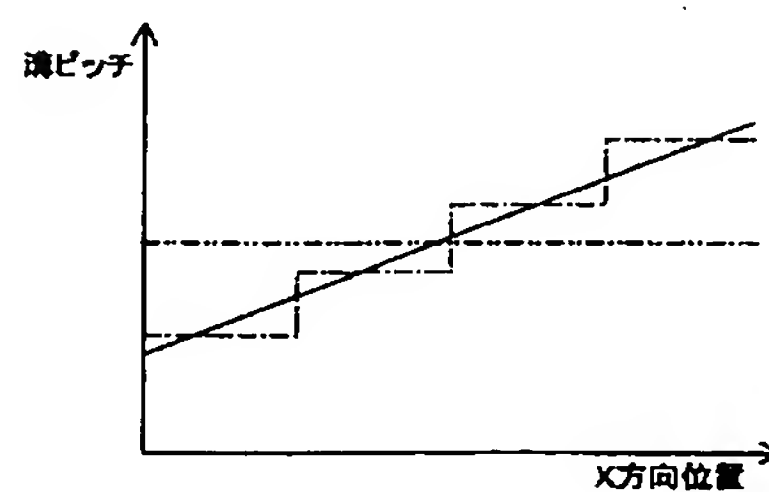
【図4】



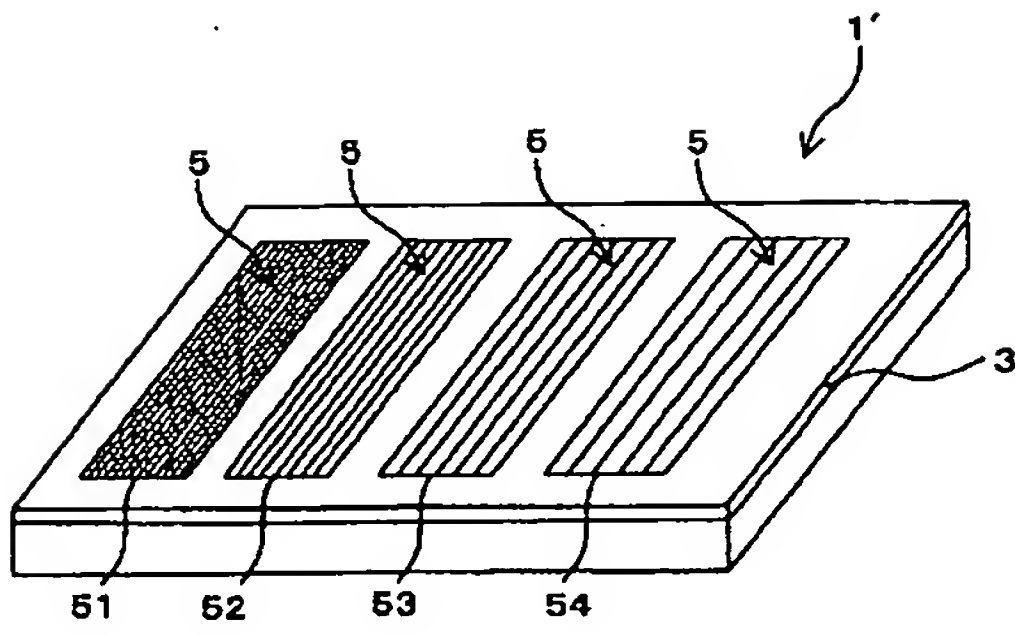
【図16】



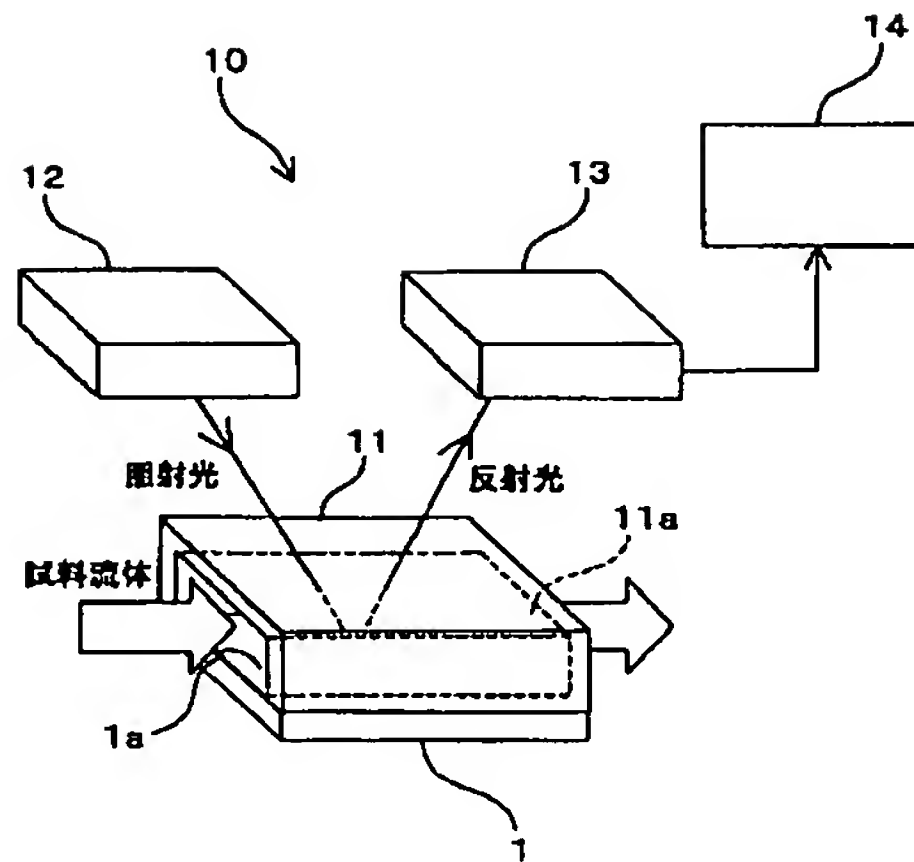
【図17】



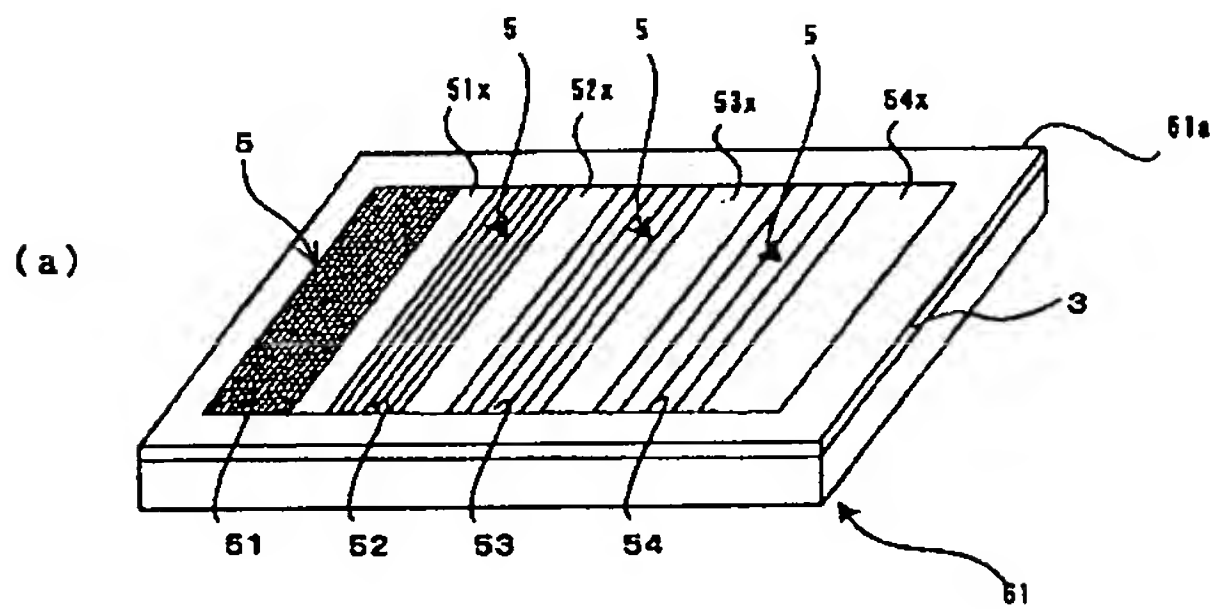
【図5】



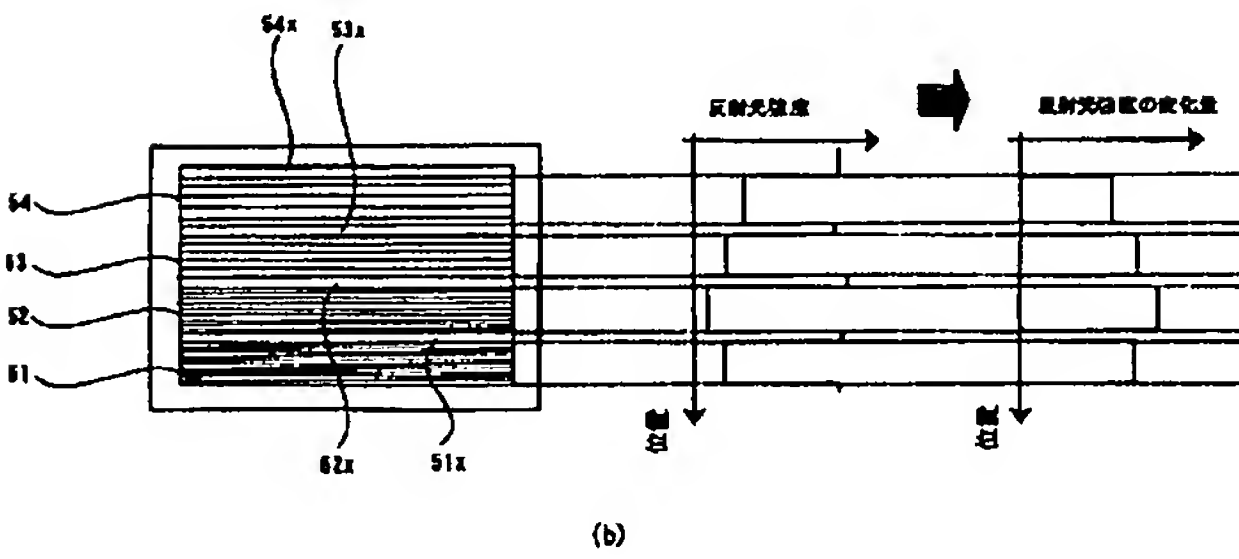
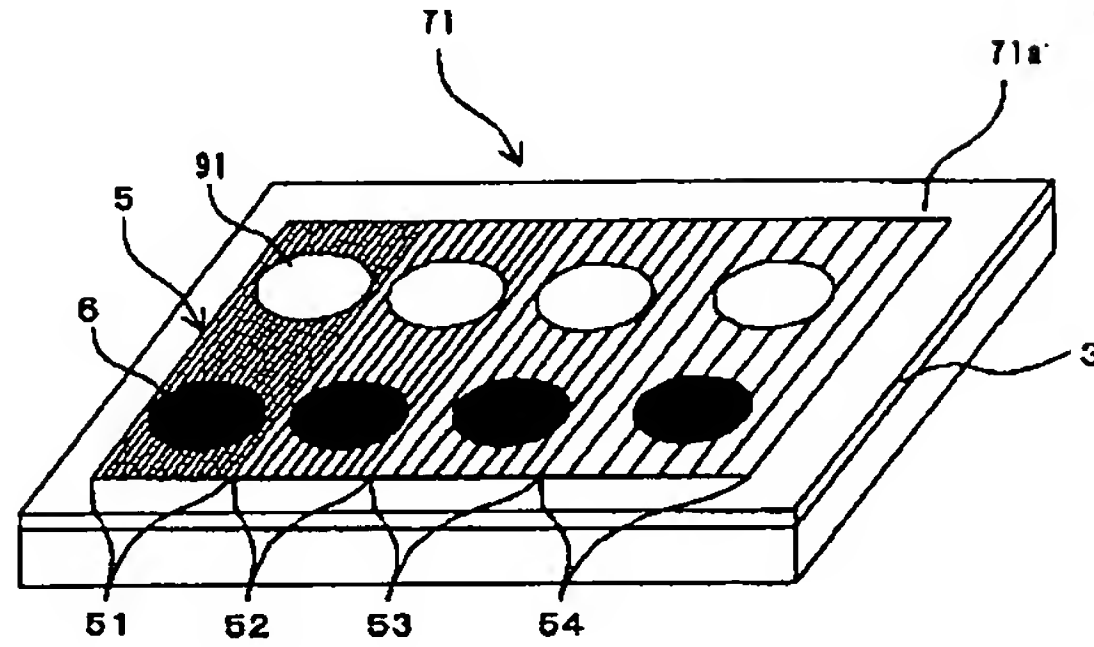
【図6】



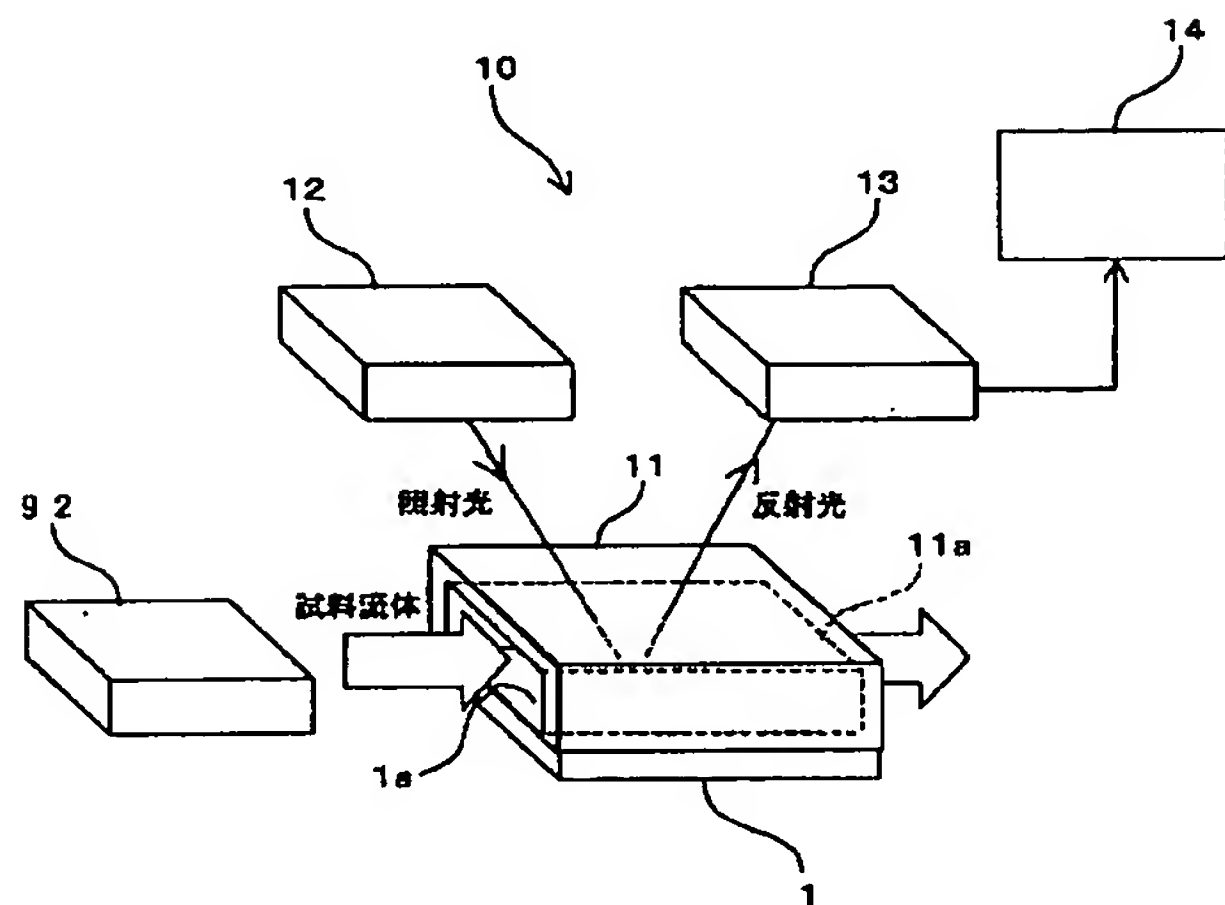
【図7】



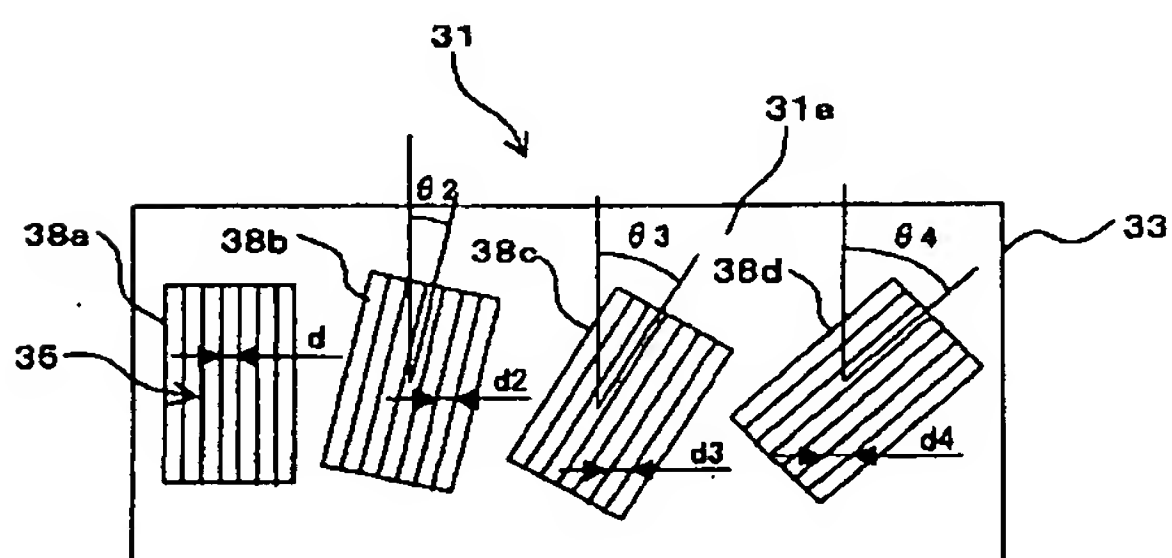
【図8】



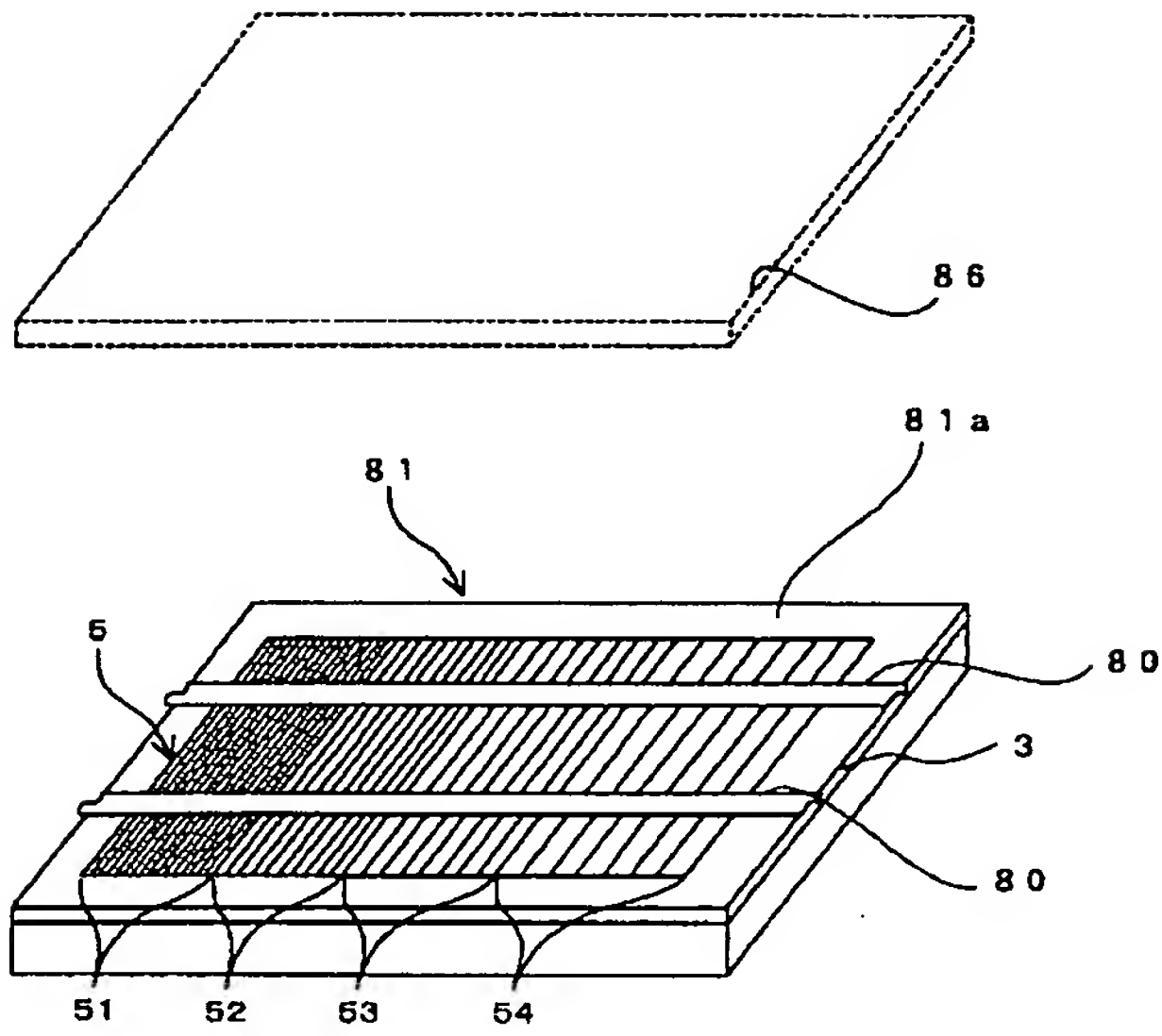
【図9】



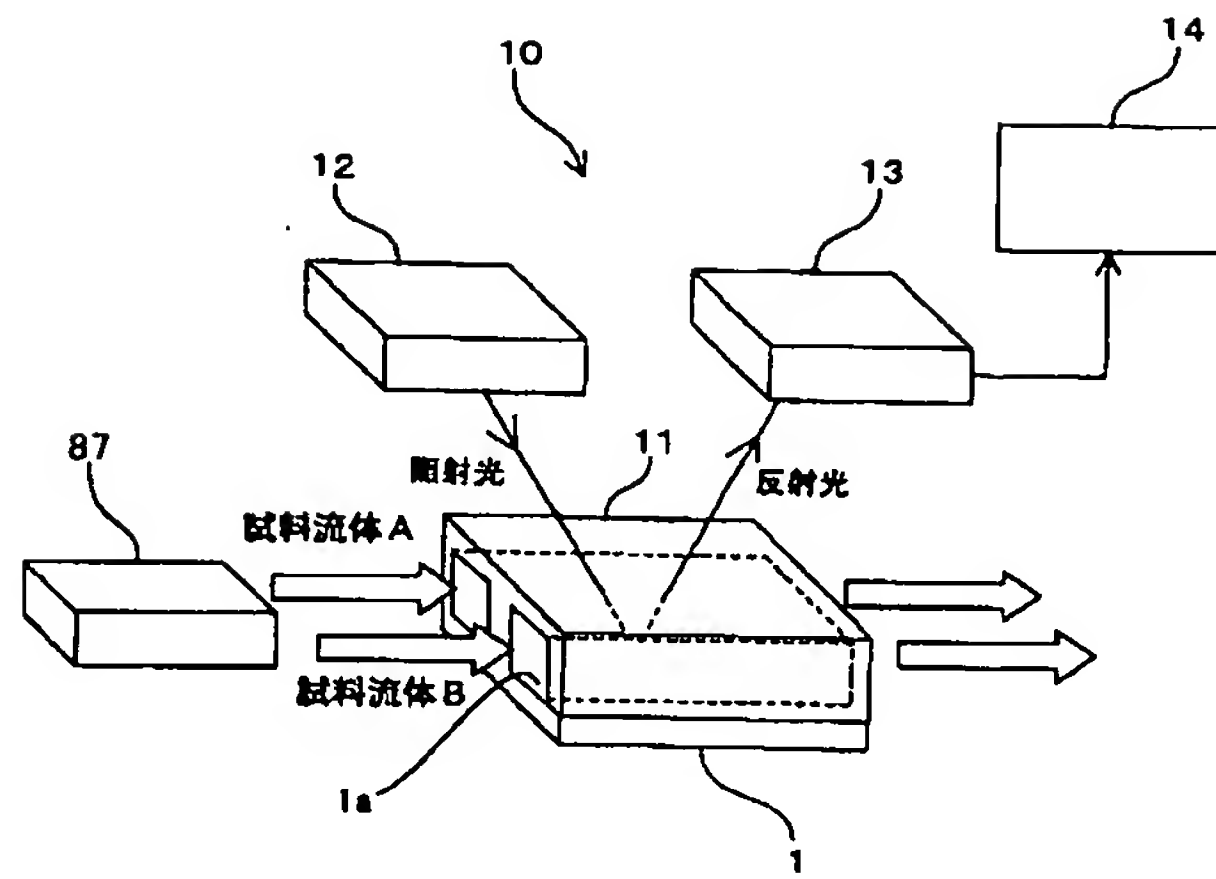
【図19】



【図10】

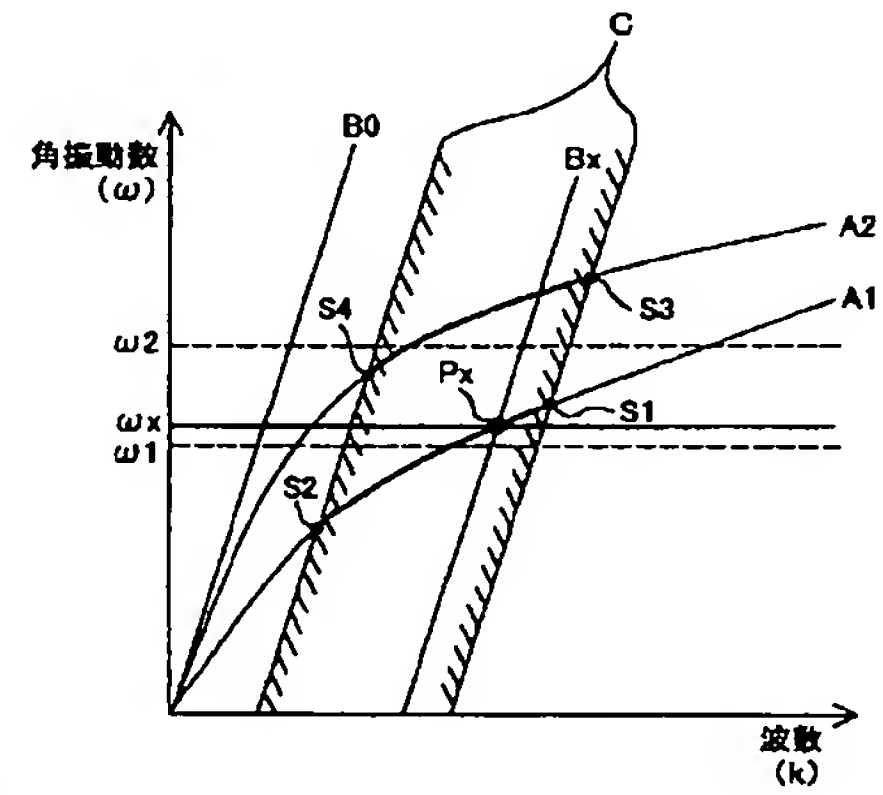
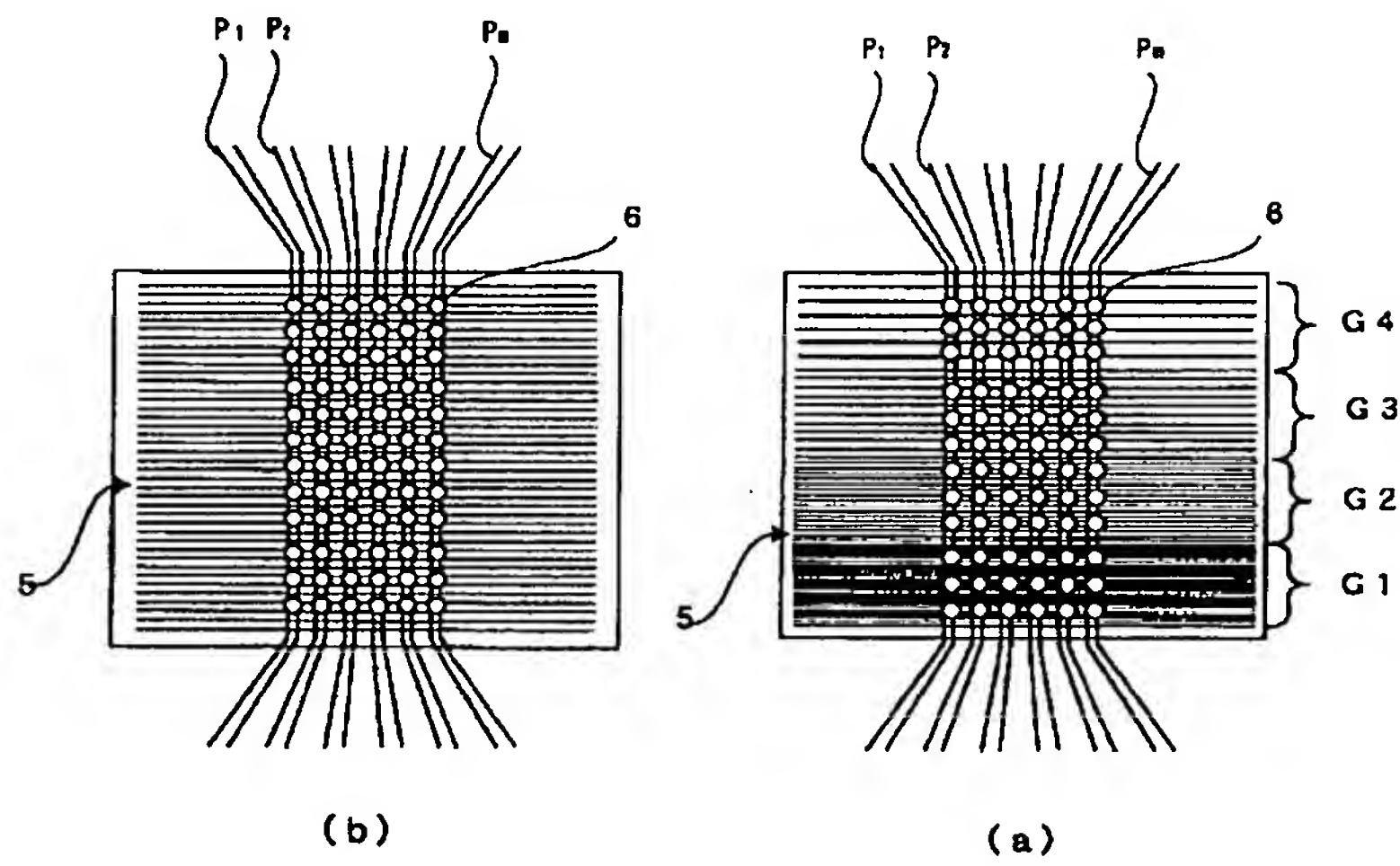


【図11】

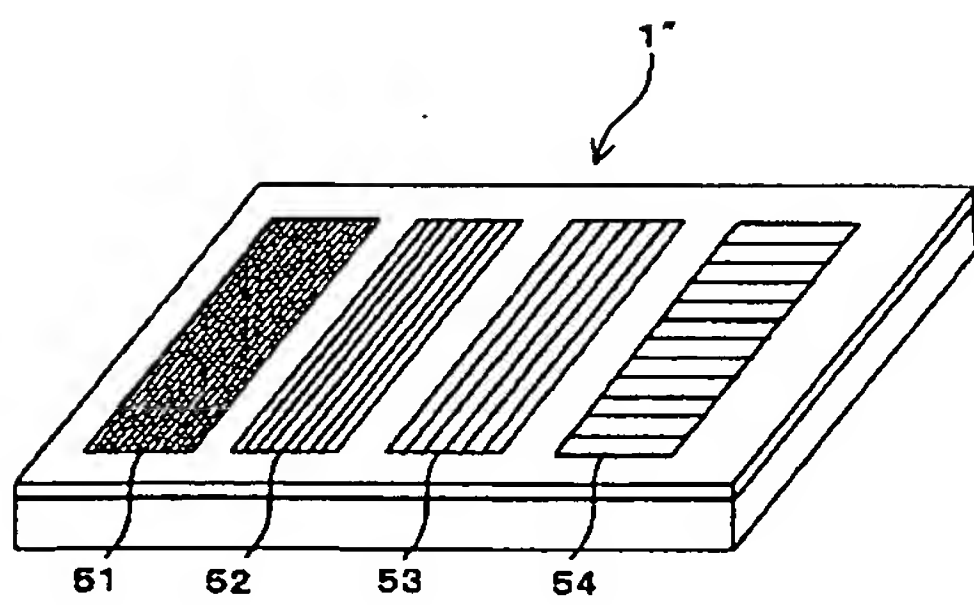


【図18】

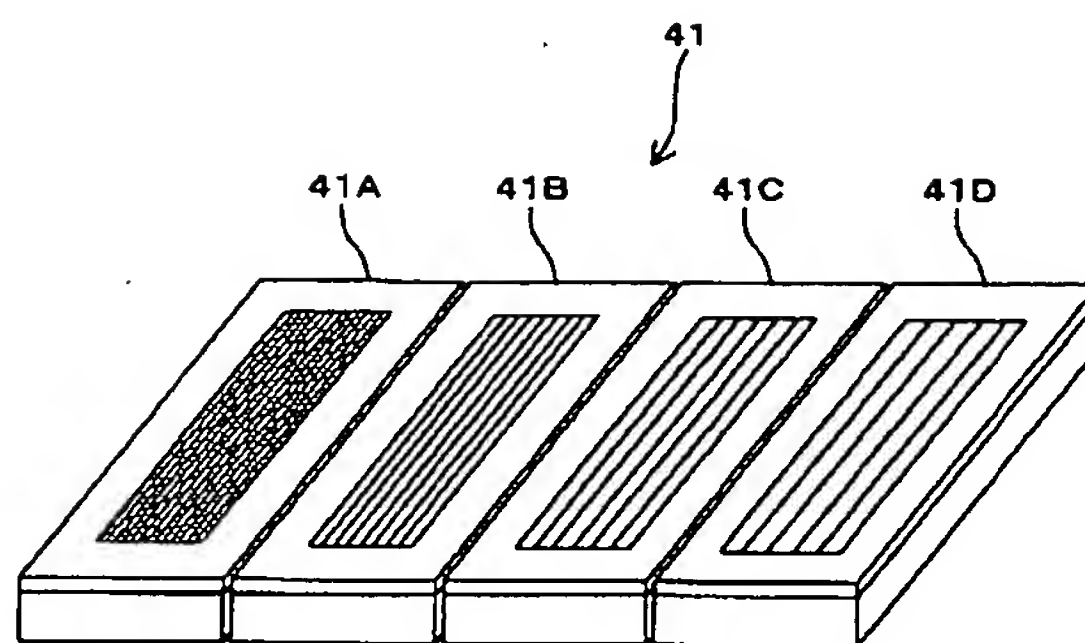
【図12】



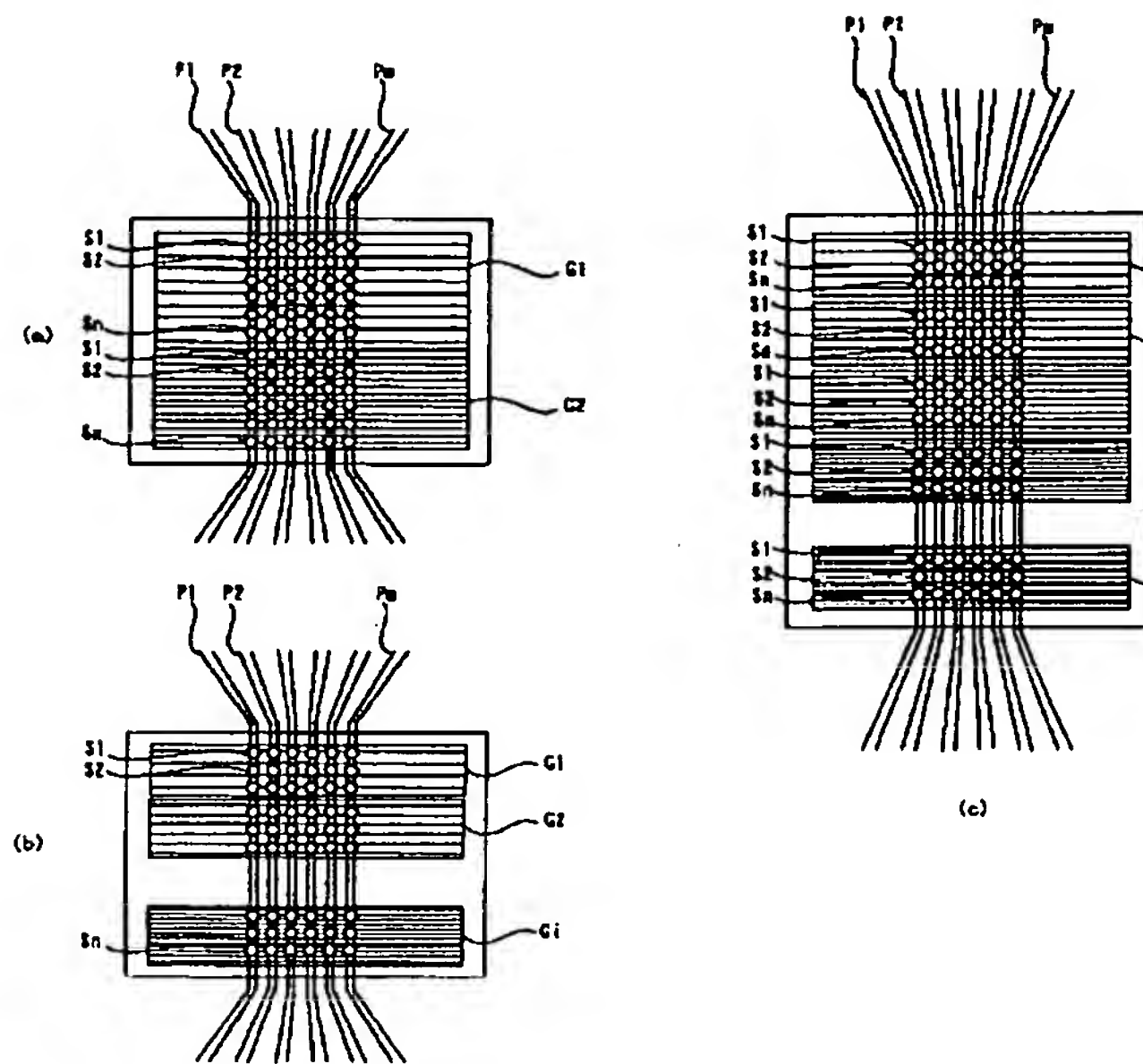
【図20】



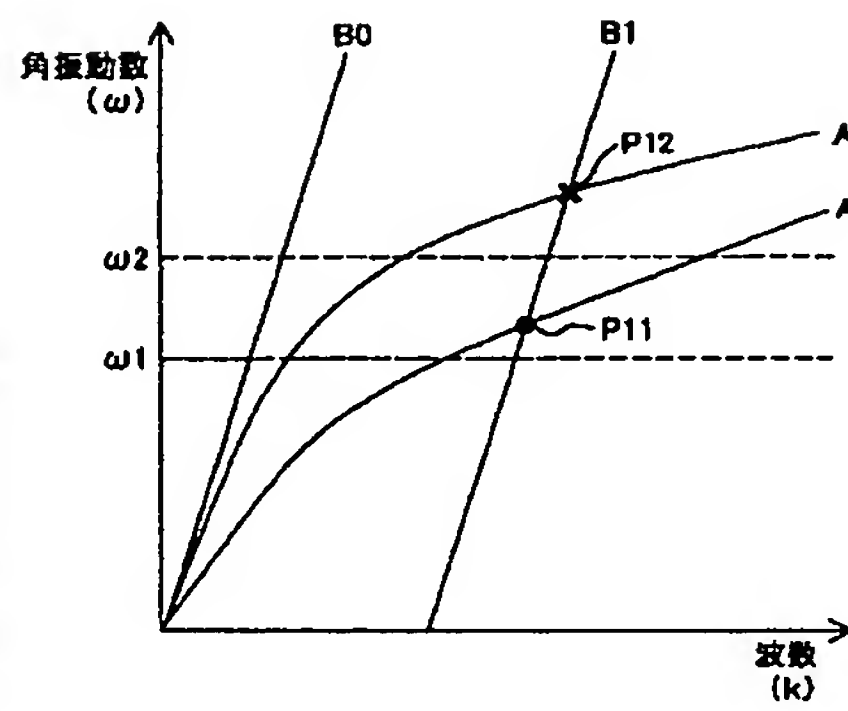
【図21】



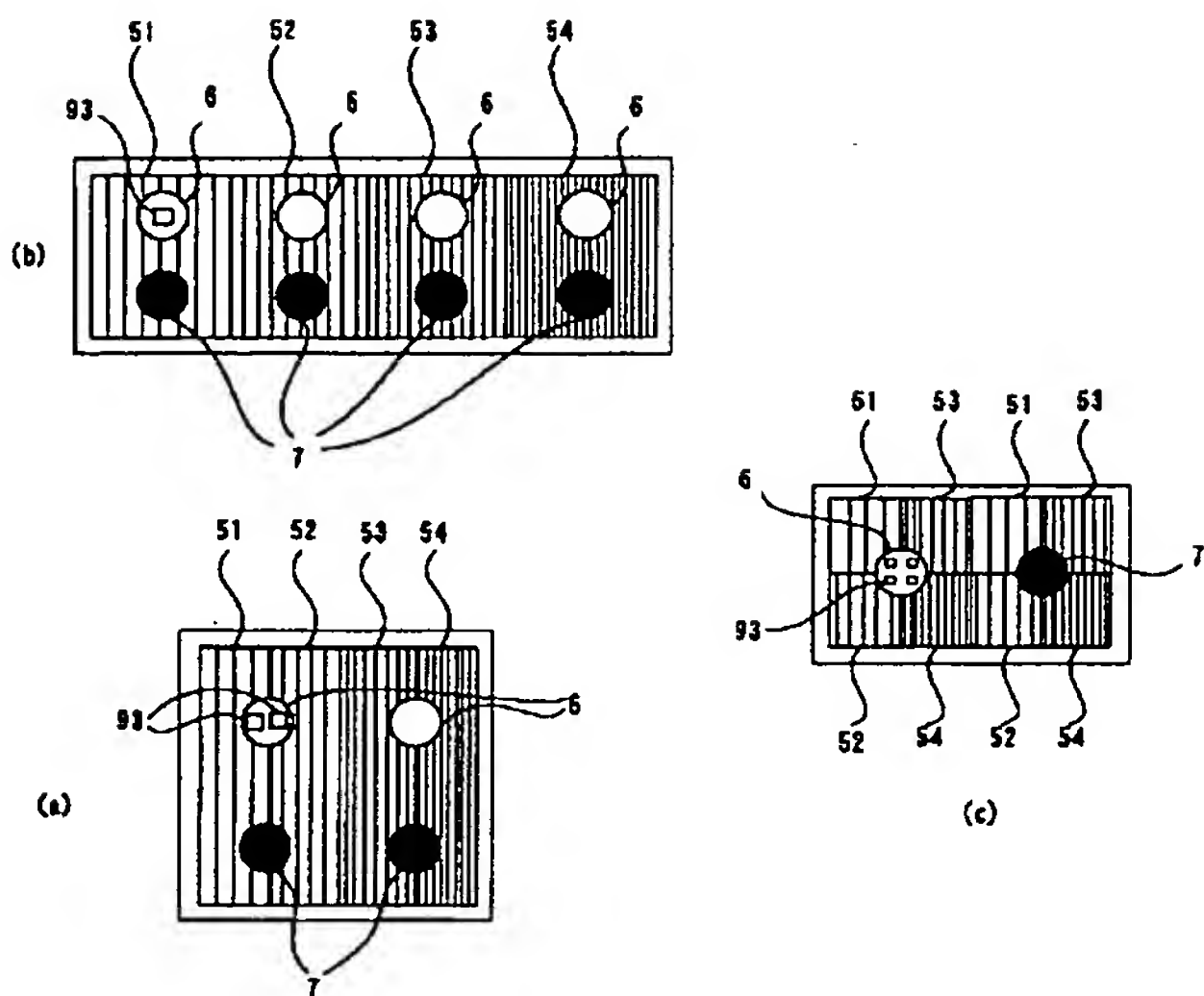
【図13】



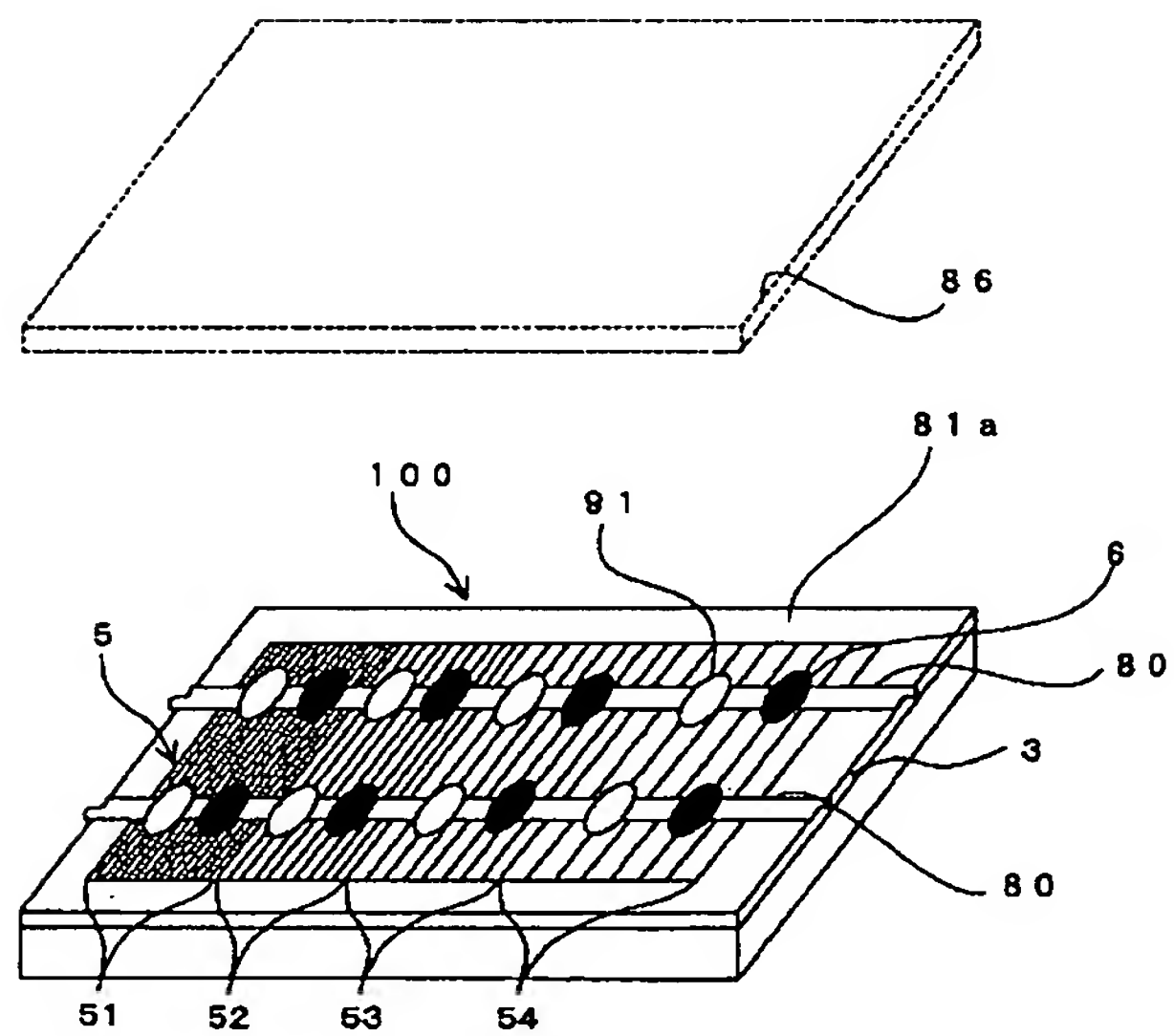
【図25】



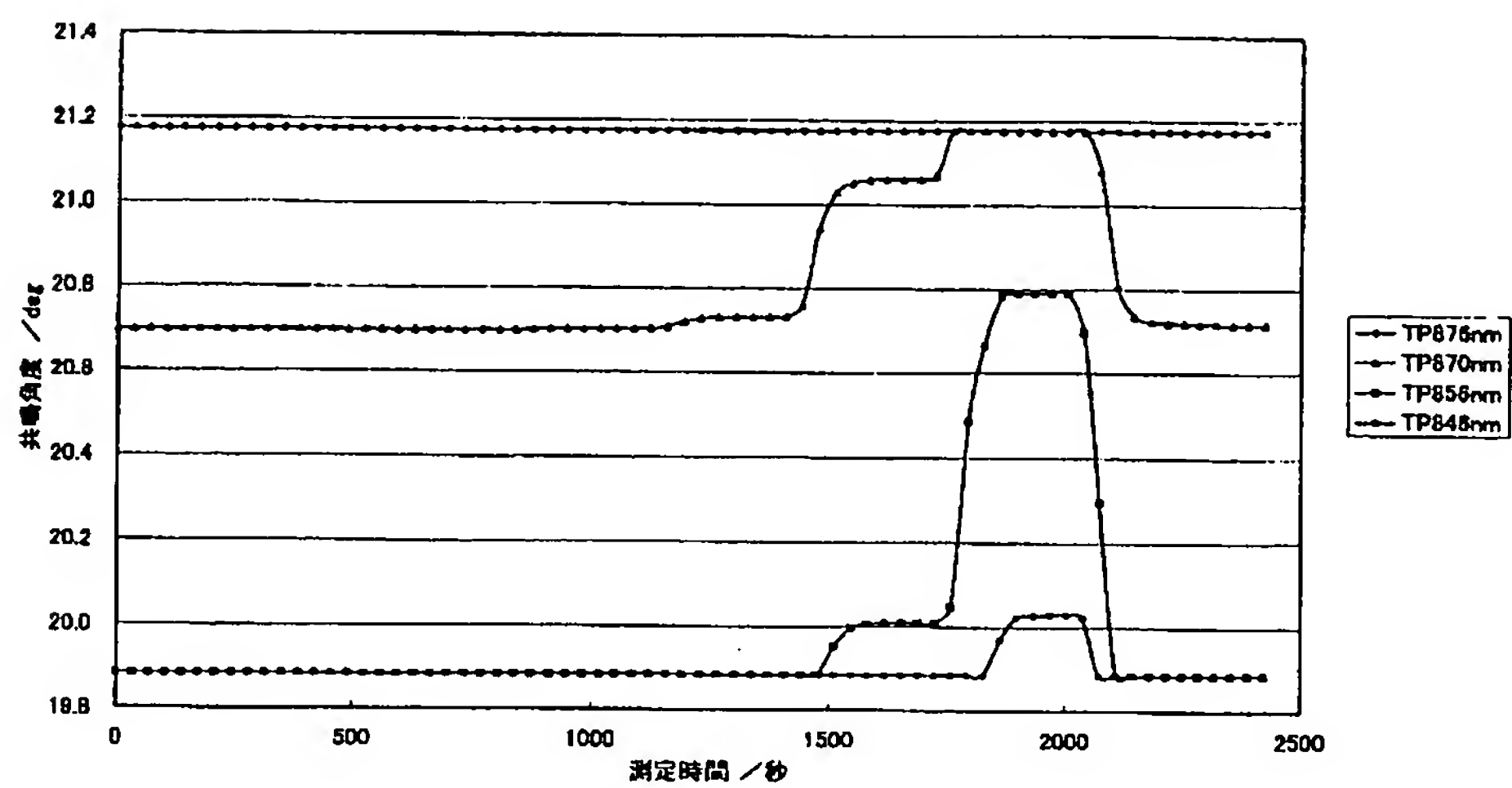
【図14】



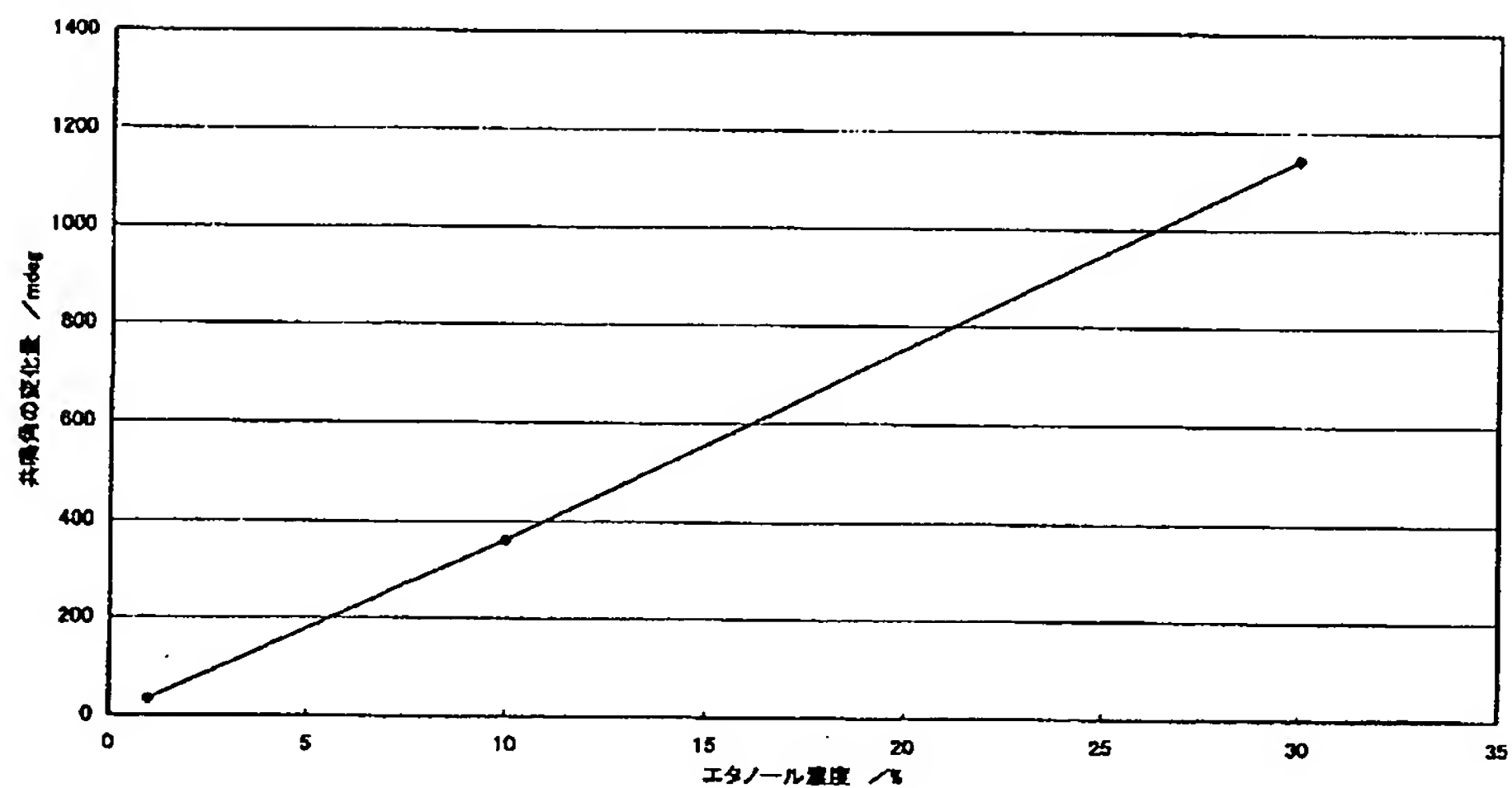
【図15】



【図22】

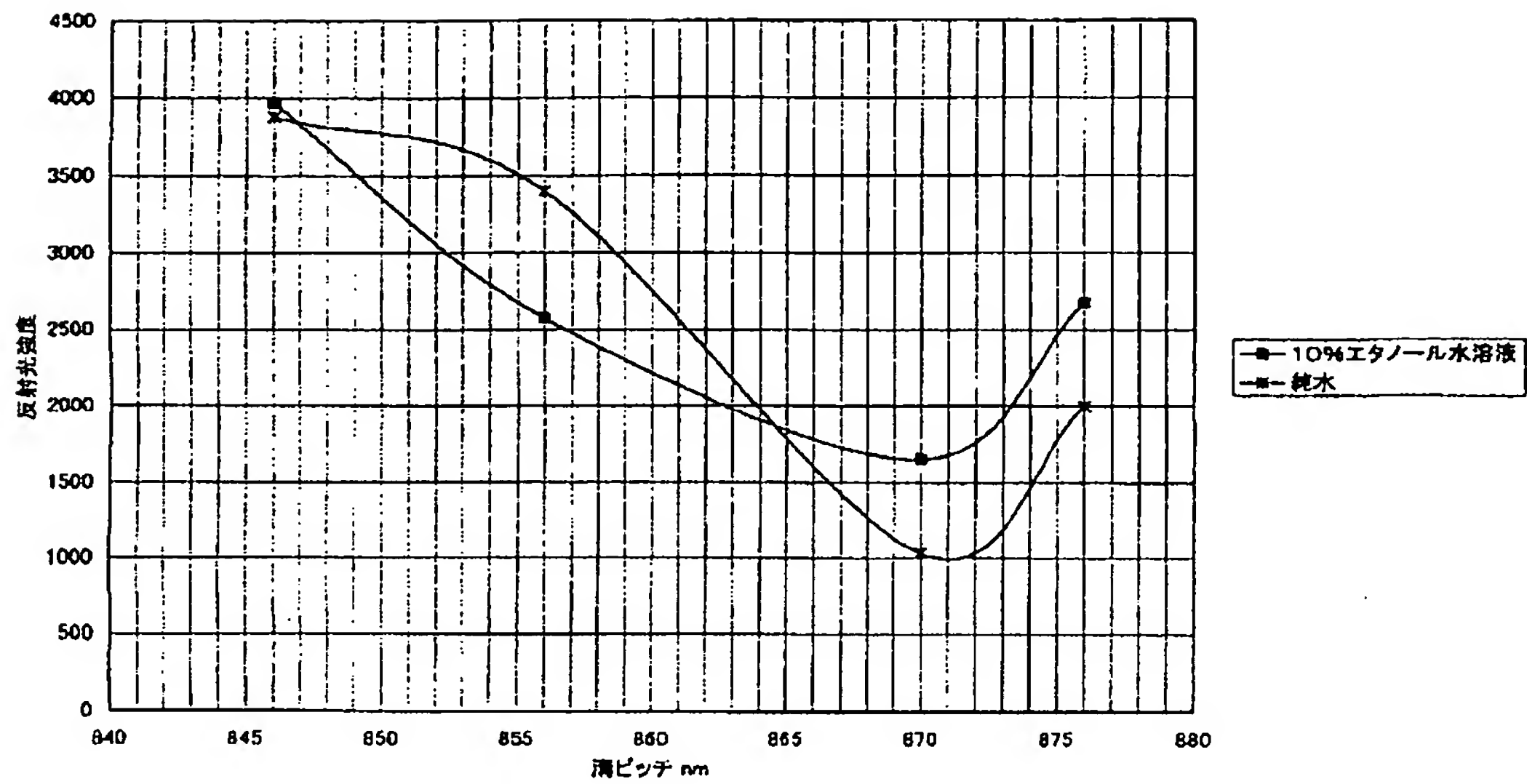


【図23】

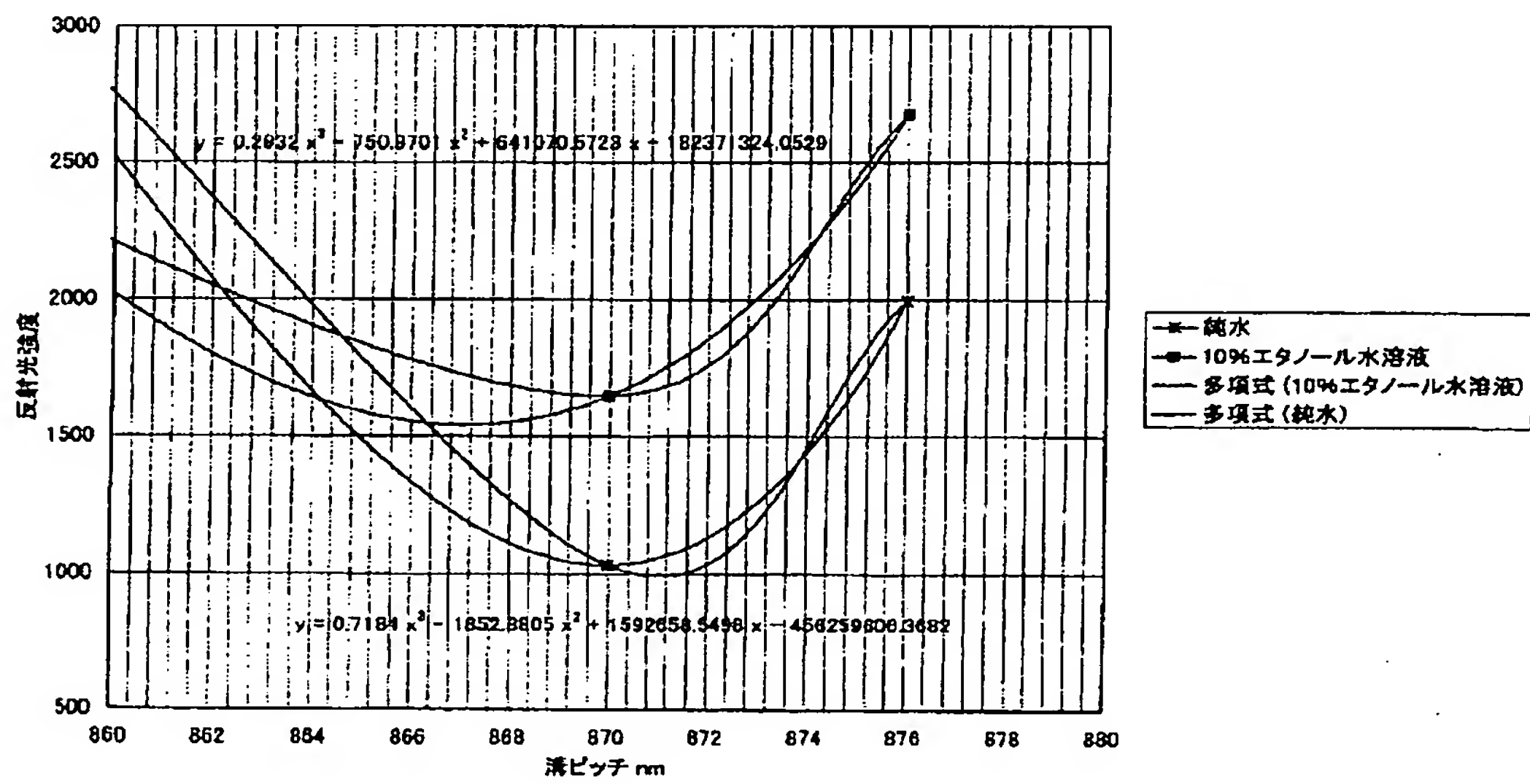


【図24】

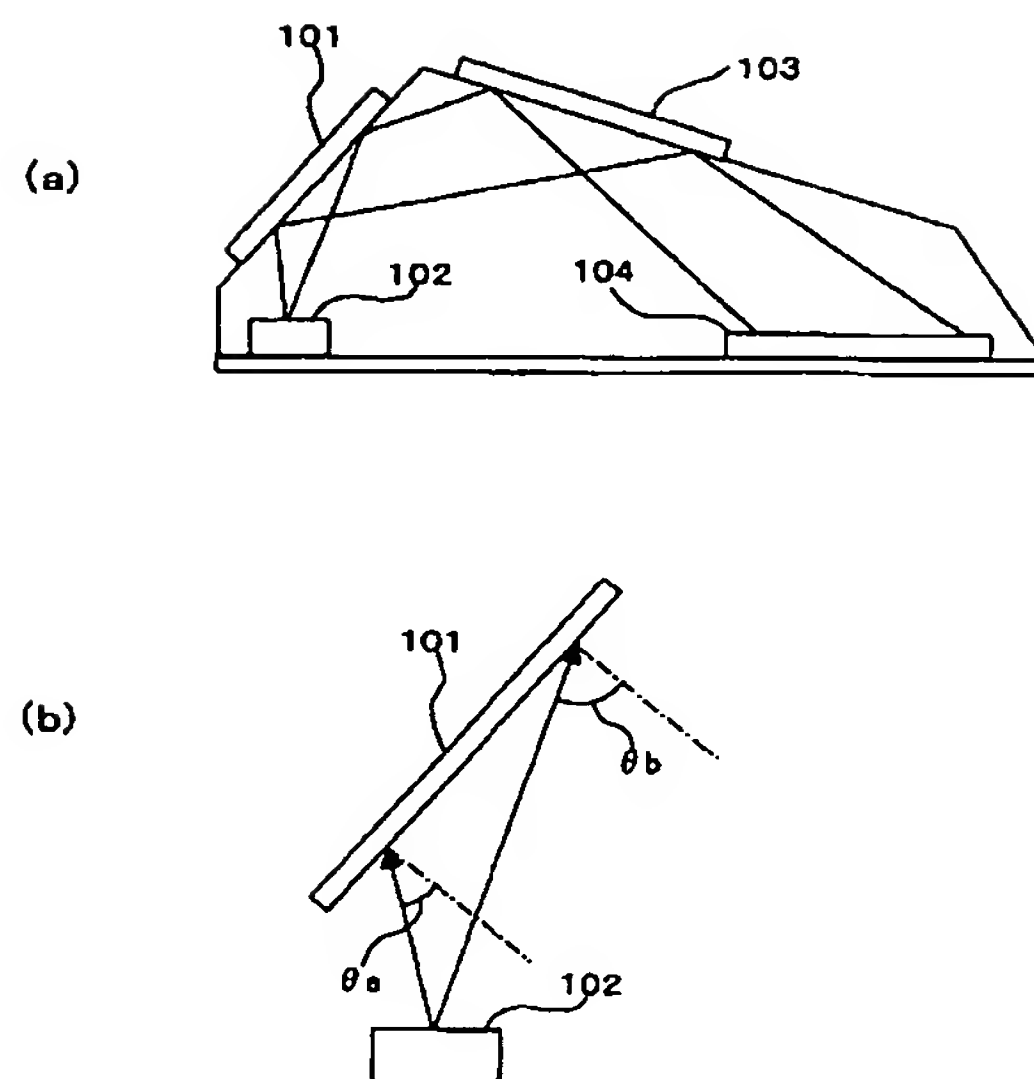
(a)



(b)



【図26】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

識別記号

F I

ターム(参考)

// G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 33/483

C

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA14 CA03 DA05 EA01

EA14 EA18 EA19 GA07 GB19

HA07 KA07 KA09 LA03 NA01

NA11

2G045 FA11 GC11 JA01 JA07

2G057 AA02 AA04 AB04 AB07 AC01

BA05

2G059 AA01 BB04 BB12 CC13 CC16

DD12 EE02 EE05 EE07 FF11

GG01 GG04 GG10 JJ01 JJ03

JJ05 JJ19 KK04 MM05 MM14